

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

Modelo de doença de Alzheimer pela infusão intracerebroventricular de  
estreptozotocina: influência do tempo de administração e do sexo dos animais  
sobre parâmetros neurogliais

Regina Biasibetti

Orientador: Professor Carlos Alberto Gonçalves

Porto Alegre

2016

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

Modelo de doença de Alzheimer pela infusão intracerebroventricular de  
estreptozotocina: influência do tempo de administração e do sexo dos animais  
sobre parâmetros neurogliais

Regina Biasibetti

Orientador: Professor Carlos Alberto Gonçalves

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito  
parcial à obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Porto Alegre

2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Biasibetti, Regina  
Modelo de doença de Alzheimer pela infusão  
intracerebroventricular de estreptozotocina:  
influência do tempo de administração e do sexo dos  
animais sobre parâmetros neurogliais / Regina  
Biasibetti. -- 2016.  
93 f.

Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Alzheimer. 2. astrócitos. 3. estreptozotocina.  
4. hipocampo. 5. sexo. I. Gonçalves, Carlos Alberto  
Saraiva, orient. II. Título.

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

Para todos os olhares  
que cruzaram meu caminho em solo angolano.

*“A Tate, m’ovoko ove numbika omwenho wange.”*

Osamo 31

*“Deus, eu tuas mãos coloco meu espírito.”*

Salmo 31

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, a quem não existe o impossível.

Agradeço à minha família: mãe **Sirlei**, pai **Gaspar**, irmãos **Victor** e **Laura**, vocês são minha fortaleza, meu refúgio, meu motivo. Obrigada pelas viagens, pelos churrascos, pelas canastras, pela acolhida, mas, principalmente, obrigada pelo apoio emocional e constante. Fez toda a diferença!

Agradeço de maneira especial ao meu querido orientador, psicólogo e amigo **Carlos Alberto Gonçalves**, ou CA, nosso centro de apoio, com quem convivo há 11 anos e quem me inspira a lutar pelos meus ideais da maneira mais sublime: sendo exemplo e testemunho. Obrigada, obrigada! A ele também agradeço por trazer para perto uma pessoa de coração ímpar, disposta a alegrar a todos(as) a sua volta. Patty, um beijo!

Meu muito muito muito obrigada aos meus queridos e minhas queridas parceiros(as) de trabalho no laboratório 33: **Lets**, minha chefe, minha IC, minha parceira de comportamentos, de longas gargalhadas, de RU, de confidências, de apoio inquestionável, minha irmã, minha amiga! Obrigada por voltar pra nós, te amo! **Krista**, a eficiência em pessoa, sempre ágil, inteligente, confiando em mim muito mais do que eu mesma, disposta a ajudar, a pegar junto, foste indispensável pra esta tese se realizar, dankeschön! **JP**, incansáveis cirurgias e longas conversas durante, que muitas vezes continuavam de maneira virtual quando chegávamos a nossas casas, obrigada pela grande ajuda! Um agradecimento também pela nossa divertida sintonia no quesito coreografias. Adoro! **Lucas**, meu bolsista, obrigada pela ajuda em todos os momentos! Estiveste ao meu lado do início ao fim do trabalho e abraçaste a causa. Sempre interessado, disponível, atento, obrigada por me permitir fazer parte da tua formação! **Nicholas**, meu querido, que alegria ter podido conviver contigo neste tempo, obrigada pela autenticidade com que encara a vida, a confiança em ti é fruto disso também. À **Pati Nardin**, agradeço pelos ensinamentos, pela ajuda e pelo colo de mãe. À **Dandara**, agradeço pela ajuda nos experimentos e na revisão. Aos demais integrantes do laboratório 33, **Adri**, **Andréia**, **Bárbara**, **Caro**, **Cris**, **Dani**, **Fê Hansen**, **Giana**, **Lari** e **Tutti**, obrigada pelos momentos divididos dentro e fora do lab.

Meu agradecimento eterno à **Marina** e à **Ale**, pelos ensinamentos, pela paciência e pela amizade.

Agradeço à **Caren**, minha amiga, no mais profundo e simples sentido da palavra. Obrigada pelos ouvidos sempre atentos e pelas sábias palavras que pronuncias, fazes uma diferença tão grande em minha vida!

Agradeço às minhas dili amadas, que a faculdade de farmácia me trouxe: **Ana, Dani, Deni, Érica, Gabi, Gi, e Lila**, vocês são mulheres incríveis, que, quanto mais eu conheço, mais eu admiro e confio. Obrigada pela amizade!

**Érica e Lila**, curicas of Nenê07: Cumplicidade. Amizade. Risadas. Lágrimas. Amor. Desabafos. Abraços. Coração com as mãos. Salas, cozinha, banheiro. Ceva. Mais risadas. Netflix. Pombas. Contas. Parceria. Divisão. Suco da Lanchera. Grêmio. Sinuca. Sem Nome. Sushi. Mais risadas. Lar. Gratidão.

À **Aline**, a melhor amiga que a vida marista poderia ter me dado. Um ser humano sen-sa-cio-nal que me compreende, me apoia, me educa. Tu és presente e presença de Deus em minha vida!

Ao **Gustavo**, a alma mais linda que já conheci, agradeço pelas histórias de vida que partilhamos, pela confiança e por teu sorriso.

Agradeço aos colegas e amigos da sede, pelo apoio, amizade e compreensão, em especial ao nosso melhor 5º andar.

Aos queridos e às queridas fraternos(as) da Jovem Montagne, obrigada pelos momentos de oração, partilha, formação e diversão!

Aos funcionários(as) e professores(as) da UFRGS, em especial os(as) do PPG Bioquímica, obrigada por tudo!

À CAPES agradeço a concessão da bolsa.

Por fim, o agradecimento que me traz as memórias mais lindas e, ao mesmo tempo, uma saudade que nada é capaz de abrandar. O ensinamento mais valioso que tive neste tempo de doutorado...

Aos alunos, alunas, amigos, amigas, irmãos e irmãs angolanos(as): vocês me ensinaram a ter fé e no coração me fizeram acreditar, que com pouco na vida pela vida se pode lutar.

Continuo a rezar para o sol dançar.

*Twapandula tchalwa, ame ndukusoli tchalwa! Utima wange wiyevite ongeva. Suku akusandeleli, salipo tchiwa. Amyulo yapa a Ñgala, nume kuosi oiyongola.*

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

## Sumário

APRESENTAÇÃO.....	1
Lista de abreviaturas.....	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
1. Demência.....	7
2. Astrócitos e doença de Alzheimer.....	12
3. Modelo de doença de Alzheimer esporádica.....	15
4. Hormônios sexuais e o sistema nervoso central.....	17
OBJETIVOS.....	21
CAPÍTULO I.....	22
CAPÍTULO II.....	33
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	37
CAPÍTULO III.....	44
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	57
1. Alterações hipocampais e cerebelares no modelo de demência induzido por infusão ICV de STZ.....	57
2. Secreção de S100B mediada por BDNF em fatias hipocampais.....	68
CONCLUSÕES.....	70
PERSPECTIVAS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72



## APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada em seções organizadas da seguinte maneira: Introdução, Resultados (Capítulo I, Capítulo II, Capítulo III), Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

Na Introdução são apresentados os temas estudados, a fundamentação teórica que nos levou ao desenvolvimento deste trabalho e os focos de estudo, descritos no item “Objetivos”.

A seção de Resultados está dividida em três capítulos, de acordo com os diferentes focos de estudo. Em cada capítulo estão descritos os materiais e métodos utilizados bem como os resultados obtidos, sendo o primeiro capítulo o artigo científico publicado.

Capítulo I: *Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer’s disease are dependent on sex*; Este capítulo refere-se aos objetivos 1 e 2.

Capítulo II: Alterações cerebelares no modelo animal de Doença de Alzheimer esporádica são diferentes em machos e fêmeas; Este capítulo refere-se ao objetivo 3.

Capítulo III: Secreção de S100B em fatias hipocampais de ratos submetidos ao modelo de demência induzido por STZ: sinalização via BDNF; Este capítulo refere-se à investigação de alterações *ex vivo* hipocampais de resposta astrogliar, medida pela secreção de S100B, ao estímulo por incubação de alto potássio e BDNF.

A Discussão contém a argumentação bibliograficamente embasada da interpretação e da importância dos resultados obtidos nos três capítulos.

A seção Conclusões aborda as hipóteses concluídas na tese.

Nas perspectivas, estão elucidados os próximos passos para que os capítulos II e III sejam complementados e publicados na forma de artigos científicos, bem como as novas abordagens suscitadas pela tese que podem ser investigadas a fim de colaborar com a linha de estudo.

A seção Referências Bibliográficas lista as referências utilizadas na redação da tese, exceto o Capítulo I que tem sua própria lista de referências.

## Lista de abreviaturas

**18F-FDG**, fluorodesoxiglicose

**ANA-12**, N-[2-[(2-Oxoazepan-3-il)carbamoil]fenil]-1-benzotiofeno-2-carboxamida

**APP**, proteína precursora amiloide

**AR**, receptor de andrógenos

**A $\beta$** ,  $\beta$ -amiloide

**BDNF**, fator neurotrófico derivado do encéfalo

**ChAT**, colina acetiltransferase

**CREB**, proteína elemento-ligante em resposta ao AMP cíclico

**DA**, doença de Alzheimer

**DMSO**, dimetilsulfóxido

**DNA**, ácido desoxirribonucleico

**EDTA**, ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA**, enzimaímunoensaio

**ER**, receptor de estrógenos

**GFAP**, proteína glial fibrilar ácida

**GluT**, transportador de glicose

**GPx**, glutaciona peroxidase

**GSH**, glutaciona reduzida

**GSK 3**, glicogênio sintase cinase 3

**HBSS**, solução salina balanceada de Hank

**ICV**, intracerebroventricular

**IGF**, fator de crescimento semelhante à insulina

**ip**, intraperitoneal

**LAM**, labirinto aquático de Morris

**LCR**, líquido cefalorraquidiano

**LDH**, lactato desidrogenase

**LIMK**, proteína cinase de domínio LIM

**LTP**, potenciação de longa duração

**mRNA**, ácido ribonucleico mensageiro

**MTT**, Bromido de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio

**NAD**, nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NGF**, fator de crescimento neural

**NT**, neurotrofina

**OMS**, Organização Mundial da Saúde

**PARP**, poli-ADP-ribose-polimerase

**PET**, tomografia por emissão de pósitrons

**PI3K**, fosfatidil inositol-3 cinase

**PKB**, proteína cinase B/Akt

**PR**, receptor de progesterona

**PSD-95**, densidade pós-sináptica 95

**RAGE**, receptor de produtos finais de glicação avançada

**Ras-MAP**, proteína cinase ativada por mitógeno ligada à Ras

**RI**, receptor de insulina

**SNC**, sistema nervoso central

**SOD**, superóxido dismutase

**STZ**, estreptozotocina

**Trk**, receptor de tropomiosina cinase

## RESUMO

Muitos trabalhos têm demonstrado a correlação existente entre gênero e prevalência da doença de Alzheimer (DA), sendo que as mulheres compreendem dois terços dos pacientes afetados. A estreptozotocina (STZ) é uma substância que vem sendo muito utilizada, por administração intracerebroventricular, para produzir um modelo de doença de Alzheimer esporádica com características neuroquímicas e fisiopatológicas semelhantes à DA, em roedores. Dessa forma, essa tese teve como objetivo avaliar as alterações comportamentais cognitivas e parâmetros neuroquímicos (ChAT, S100B, GFAP, GSH e captação de glicose) em hipocampo e cerebelo de ratos e ratas expostas ao modelo de doença de Alzheimer por STZ. Para um melhor entendimento das alterações, as avaliações foram realizadas em três diferentes tempos após a indução do modelo: duas, quatro e oito semanas. Como resultado, encontramos declínio cognitivo e alterações neuroquímicas hipocámpais e cerebelares. Interessantemente, machos e fêmeas apresentaram distintas respostas frente ao insulto por STZ, mostrando ser este um campo interessante para caracterização e aprofundamento do modelo que utilizamos. Este trabalho confirma o comprometimento cognitivo e as alterações neuroquímicas presentes no modelo e estes se somam às variações funcionais encontradas nos astrócitos. Tais alterações também estão presentes na DA, apontando a interação neuroglial como um importante alvo de estudo na doença e, conseqüentemente, na busca por alternativas terapêuticas.

## **ABSTRACT**

Many studies have demonstrated the correlation between gender and prevalence of Alzheimer's disease (AD), with women comprising two thirds of the affected patients. Streptozotocin (STZ) is a substance that has been widely used by intracerebroventricular administration to produce a model of sporadic Alzheimer's disease with neurochemical and pathophysiological characteristics similar to AD, in rodents. Thus, this thesis aimed to evaluate cognitive behavioral changes and neurochemical parameters (ChAT, S100B, GFAP, GSH and glucose uptake) in the hippocampus and cerebellum of rats (males and females) exposed to the model of sporadic Alzheimer's disease by STZ. For the best comprehension of the changes, the evaluations were performed at three different times after the induction of the model: two, four and eight weeks. As a result, we found cognitive decline and hippocampal and cerebellar neurochemical changes. Interestingly, males and females presented different responses to STZ damage, showing that this is an interesting field for characterization and deepening of the model we use. This work confirms the cognitive impairment and the neurochemical changes present in the model and these are added to the functional shifts found in the astrocytes. These alterations are also present in AD, pointing to neuroglial interaction as an important target for the study of the disease and, consequently, the search for therapeutic alternatives.

## INTRODUÇÃO

### 1. Demência

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define demência como uma síndrome em que ocorre a deterioração da função cognitiva além do que se espera para os indivíduos que estão envelhecendo, afetando memória, orientação espacial, cálculos, compreensão, capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento. Demência é uma das maiores causas de incapacidade e dependência entre pessoas idosas, sendo que os sintomas iniciais são: esquecimento, perda do controle do tempo e perder-se em lugares familiares. Esta perda substancial das habilidades intelectuais, memória em especial, de uma maneira severa a ponto de interferir com a vida social, profissional e emocional dos indivíduos (RADEMAKERS; ROVELET-LECRUX, 2009) é resultado de um complexo declínio cognitivo devido a uma disfunção crônica e progressiva da atividade cortical e/ou subcortical (RITCHIE; LOVESTONE, 2002). Tais sintomas se apresentam de uma maneira mais pronunciada do que aqueles observados como consequência do envelhecimento, quando todas as funções celulares, de uma maneira geral, estão em declínio. A OMS estima que as demências atinjam, na atualidade, 47,5 milhões de pessoas, sendo descobertos 7,7 milhões de novos casos a cada ano (“OMS | Demencia”, [s.d.]).

Atualmente, o diagnóstico de um(a) paciente com demência é feito antes mesmo do comprometimento das funções intelectuais e das atividades de vida diária do(a) mesmo(a), graças a técnicas de imageamento encefálico e marcadores periféricos (KURZ; LAUTENSCHLAGER, 2010). Por outro lado, a confirmação diagnóstica da Doença de Alzheimer (DA), o principal tipo de

demência, só pode ser obtida com a análise morfológica *post mortem* do tecido encefálico.

A DA é a forma mais comum de demência e pode contribuir para 60-70% dos casos. Outras formas principais incluem a demência vascular, demência com corpos de Lewy (agregados de proteínas anormais que se desenvolvem no interior dos neurônios) e um grupo de doenças que contribuem para a demência fronto-temporal (degeneração do lobo frontal do encéfalo). As fronteiras entre diferentes formas de demência são indistintas e mistas e muitas vezes podem coexistir (KALARIA, 2010).

À medida que se sucede um aumento da expectativa de vida da população, aumenta a ocorrência de doenças associadas ao envelhecimento. Tal fato torna a doença um grave problema de saúde pública e um enorme custo para o sistema governamental, fazendo com que a busca por alternativas de terapia e prevenção seja extremamente relevante e emergencial.

### 1.1. Doença de Alzheimer

A DA é uma das mais debilitantes desordens neurodegenerativas, afetando indivíduos de meia-idade e da terceira idade, com uma prevalência maior naqueles(as) que possuem mais de 65 anos (SULTANA; PERLUIGI; ALLAN BUTTERFIELD, 2013). Dentre os casos familiares e esporádicos de DA, os esporádicos compreendem aproximadamente 95% e são resultado de uma complexa sequência de fatores etiológicos (BARONE et al., 2014). Somando-se aos fatores de risco genéticos, há vários fatores ambientais e de estilo de vida que aumentam o risco para desenvolvimento da DA. Os fatores que possuem



uma correlação positiva com a doença de Alzheimer são: baixo nível de educação (FERRARI et al., 2014; SHARP; GATZ, 2011), ferimentos na cabeça (BREUNIG; GUILLOT-SESTIER; TOWN, 2013), obesidade (EMMERZAAL; KILIAAN; GUSTAFSON, 2015) e poluição do ar (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2012). Alto nível de instrução (SHARP; GATZ, 2011) e prática de exercício físico (BROWN et al., 2013; TOLPPANEN et al., 2015) estão negativamente correlacionados ao aparecimento da doença.

As diferenças entre gêneros também são vistas no desenvolvimento da DA, sendo que as mulheres compreendem dois terços da população afetada pela doença (LAWS; IRVINE; GALE, 2016). Além disso, a progressão da doença difere entre os sexos, onde os homens mostram uma progressão mais acelerada (LAPANE et al., 2001) enquanto as mulheres apresentam menor severidade (BARNES et al., 2005; CORDER et al., 2004; IRVINE et al., 2012), vivendo tempo maior com a doença.

#### 1.1.1. Características clínicas e fisiopatológicas

A DA é caracterizada pela ocorrência de uma diminuição da capacidade do indivíduo de formar novas memórias e de lembrar acontecimentos recentes, entre outros distúrbios neuropsiquiátricos como alterações de personalidade e humor (CUMMINGS et al., 1994; SELKOE, 2001). Histopatologicamente, há evidências de uma extensa perda neuronal, com presença das chamadas placas senis formadas pelo depósito extracelular do peptídeo beta amiloide e por emaranhados neurofibrilares intracelulares resultantes da deposição anormal de uma proteína associada aos microtúbulos, a proteína tau, hiperfosforilada ou poliubiquitinada (DUYCKAERTS; DELATOUR; POTIER, 2009; JALBERT;

DAIELLO; LAPANE, 2008; SELKOE, 2001). Em áreas relacionadas à cognição e à formação de memórias, como o córtex pré-frontal e o hipocampo, juntamente com suas regiões associadas, ocorre uma série de eventos que levam à disfunção neuronal, especialmente de neurônios colinérgicos. Deste modo, cria-se um quadro de desequilíbrio neuroquímico onde há sinais de neurodegeneração, neuroinflamação, 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 entre diferentes neurotransmissores (BUTTERFIELD; SULTANA, 2011; EIKELENBOOM et al., 2006; MCGEER; SINGH; MCGEER, 1987; SELKOE, 2001).

Há três principais hipóteses sobre o desenvolvimento da DA. A hipótese beta-amiloide (HARDY; HIGGINS, 1992), a hipótese da hiperfosforilação da proteína tau (GRUNDKE-IQBAL et al., 1986; PATRICK et al., 1999) e a hipótese colinérgica. Embora deposições de origem amiloide (peptídeo A $\beta$ ) possam ser também detectadas em pequenas quantidades em cérebros de idosos saudáveis, a produção deste tipo de peptídeo é considerada central na patologia da DA. O trabalho que pela primeira vez propôs a sequência de eventos denominada “hipótese da cascata amiloide” foi publicado no início da década de 90 e postula que o peptídeo A $\beta$  e/ou os produtos de clivagem da sua proteína precursora, uma glicoproteína integral denominada proteína precursora amiloide (APP), são neurotóxicos e podem levar à formação das placas senis, resultando em morte celular.

A proteína tau é uma proteína de microtúbulos, constituindo o citoesqueleto dos neurônios. A teoria da hiperfosforilação da tau relata que

ocorre uma fosforilação em excesso desta proteína, causando um pareamento helical dos filamentos e formação de emaranhados neurofibrilares, ocasionando a retração do corpo do neurônio e prejudicando a condução sináptica através do axônio (MUDHER; LOVESTONE, 2002). A hipótese mais antiga sobre a DA foi introduzida no início da década de 80, e descrita como a hipótese colinérgica na disfunção amnésica do idoso (BARTUS et al., 1982; COYLE; PRICE; DELONG, 1983). A importância da função colinérgica nos processos de aprendizagem e memória é conhecida desde o início da década de 70 (DEUTSCH, 1971) e as pesquisas a respeito da importância do sistema colinérgico na DA demonstraram diversas características, como a diminuição do conteúdo da enzima colina acetiltransferase (ChAT) no córtex e no hipocampo, assim como uma redução variável dos neurônios colinérgicos localizados no núcleo basal de Meynert (DAVIES; MALONEY, 1976; KÁSA; RAKONCZAY; GULYA, 1997).

Além das citadas anteriormente, existem outras hipóteses, como a oligomérica, metálica, do estresse oxidativo, vascular, do diabetes, do colesterol e a que provém da excitotoxicidade glutamatérgica. Entretanto, a etiologia precisa da doença permanece não esclarecida, especialmente as vias moleculares através das quais as alterações patológicas causam prejuízo aos domínios cognitivos relacionados ao aprendizado e à memória. A hipótese amiloide é evidenciada por numerosos experimentos e estudos clínicos, e, apesar disso, a maioria dos ensaios clínicos que têm como alvo a eliminação do depósito de beta-amiloide não tem demonstrado eficácia na melhora da cognição (HOLMES et al., 2008).

Além das evidências histopatológicas e das hipóteses formuladas, sabe-se que a DA é uma doença neurodegenerativa relacionada ao envelhecimento

metabólico, sendo que o prejuízo no metabolismo encefálico da glicose é uma característica presente e marcante e que precede por décadas a disfunção cognitiva e as alterações patológicas (CUNNANE et al., 2011; JACK et al., 2010; REIMAN et al., 1996; SMALL et al., 1995).

## **2. Astrócitos e doença de Alzheimer**

Em 1846, o patologista Rudolf Virchow observou pela primeira vez a existência, no sistema nervoso central (SNC), de uma substância intersticial que continha células especiais estelares ou de forma alongada, morfológicamente distintas dos neurônios, a qual denominou de neuroglia. Pertencentes a este grupo, estão as células da microglia, os oligodendrócitos, as células endimárias e as mais numerosas células do SNC, os astrócitos.

Os astrócitos possuem um alto grau de plasticidade, cabendo-lhes inúmeras funções, como por exemplo: (1) direcionam e participam das funções das sinapses durante o desenvolvimento; (2) são a principal fonte de proteínas da matriz extracelular e moléculas de adesão no SNC; (3) produzem fatores tróficos, como S100B; (4) estocam glicogênio como fonte de reserva energética; (5) participam da barreira hematoencefálica, mediando o transporte de substâncias entre o sangue e o encéfalo; (6) tamponam os níveis de íons, como  $K^+$  e  $Na^+$  e, também, de lactato, preservando a atividade neuronal; (7) possuem papel crítico na captação e metabolismo de neurotransmissores, como glutamato e GABA; (8) participam na resposta imune cerebral; (9) realizam síntese e liberação de glutathione (GSH) [para revisão ver [(JESSEN, 2004; RODRÍGUEZ-ARELLANO et al., 2015)].

Os astrócitos se comunicam por junções *gap*, formando um grande sincício. Seus prolongamentos atingem as sinapses neuronais, e sua contribuição na função sináptica fica ainda mais evidente. Esta situação é denominada sinapse tripartite, onde o astrócito é considerado o terceiro elemento constituinte da sinapse (PEREA; ARAQUE, 2010). Além disso, os astrócitos apresentam receptores para neurotransmissores. Quando ativados, estimulam cascatas de sinalização que acabam por liberar substâncias neuroativas, estabelecendo uma comunicação neuroglial (ALLEN; BARRES, 2009).

### 2.1. Parâmetros para estudo dos astrócitos

A proteína glial fibrilar ácida, GFAP (do inglês *glial fibrillar acidic protein*) é o principal filamento intermediário de astrócitos maduros do SNC. É considerada um dos principais antígenos utilizados para a identificação e estudo do comportamento astrocítico. A ativação glial, em resposta à injúria, envolve mudanças em seu conteúdo. Um aumento de sua expressão no tecido, associado a condições de injúria cerebral, pode ser interpretado como sinal de astrogliose (PEKNY; PEKNA, 2014).

Os astrócitos proveem um importante sistema antioxidante para o sistema nervoso através da produção e secreção de glutathione (DRINGEN, 2000). A glutathione é um tripeptídeo ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) que atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos (POPE; MILTON; HEALES, 2008). Ela pode sofrer ação enzimática ou não enzimática na conversão do peróxido de hidrogênio em água, neutralizando esta espécie reativa.

O comprometimento desse sistema antioxidante pode influenciar na sobrevivência neuronal em certas condições patológicas que envolvem danos oxidativos, como a DA. Há evidências de que o conteúdo de GSH diminui com o envelhecimento (CUDKOWICZ et al., 1999) e de que seu fornecimento e o de precursores aos neurônios estão afetados na DA (CALABRESE et al., 2006).

A S100B é uma proteína ligante de cálcio, pertencente a uma família de proteínas chamadas S100 (solúvel em 100% de sulfato de amônio), produzida e secretada - principalmente - por astrócitos. Ela possui ações parácrinas e autócrinas, tanto intra quanto extracelulares, sobre neurônios e sobre outros astrócitos (ROTHERMUNDT et al., 2003). Dentre estas ações, estão a regulação da proliferação, diferenciação e morfologia celular, homeostase do  $Ca^{2+}$ , fosforilação e transcrição de proteínas, atividade enzimática e metabolismo (DONATO, 2003; GONÇALVES; LEITE; NARDIN, 2008). Tais efeitos são mediados, em parte, pela interação da S100B com o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), um receptor multiligante, envolvido na transdução de estímulos inflamatórios e de diversos fatores neurotróficos e neurotóxicos (DONATO, 2001, 2003).

Episódios isquêmicos, procedimentos cirúrgicos, traumatismos cranianos e distúrbios psiquiátricos provocam aumento da proteína no soro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) (ANDREAZZA et al., 2007; BERGER et al., 2002; BERTSCH et al., 2001; ROBSON et al., 2001; ROMNER et al., 2000). Já em doenças neurodegenerativas, existe uma série de controvérsias. Alguns estudos mostram aumento de S100B em análise de tecido encefálico *post mortem* de pacientes com DA (MEDA; BARON; SCARLATO, 2001; VAN ELDIK; GRIFFIN,

1994) e esclerose lateral amiotrófica (MIGHELI et al., 1999) e em LCR nos estágios iniciais da DA (PESKIND et al., 2001).

Os astrócitos também são conhecidos por estocar glicogênio e prover glicose aos neurônios quando necessário (ARGENTE-ARIZÓN et al., 2016). A glicose é convertida até lactato e este substrato é, então, transportado aos neurônios (PELLERIN, 2005) e se sabe que nos pacientes em estágio inicial da DA há uma diminuição da captação glial de glicose (FREEMANTLE et al., 2006).

### **3. Modelo de doença de Alzheimer esporádica**

Há diversos modelos animais de demência não-transgênicos que visam mimetizar algumas características neuroquímicas e comportamentais observadas em indivíduos que desenvolveram a DA. Dentre eles, destacam-se a infusão de ibotenate no núcleo basal magnocelular, comprometendo-o, assim como suas eferências colinérgicas (SWAROWSKY et al., 2008); a infusão do peptídeo beta-amiloide via intracerebroventricular (ICV) (ZUSSY et al., 2011); a oclusão permanente das carótidas comuns, causando uma hipoperfusão encefálica crônica (VICENTE et al., 2009); a infusão ICV bilateral da toxina botulínica (LACKOVIĆ; REBIĆ; RIEDERER, 2009); a infusão intrahipocampal bilateral (COSTA et al., 2012) e ICV (BROETTO et al., 2016) de ácido ocadáico e a infusão bilateral ICV de estreptozotocina (STZ) (RODRIGUES et al., 2009; TRAMONTINA et al., 2011), modelo utilizado neste trabalho.

A estreptozotocina é um fármaco de ação antibiótica utilizada experimentalmente para induzir diabetes, principalmente em roedores. Para isso, é administrada por uma via sistêmica, agindo no pâncreas, destruindo permanentemente as células beta pancreáticas produtoras de insulina,

originando, assim, um quadro de diabetes (BAYDAS et al., 2003). O mecanismo de ação da STZ consiste em sua captação pelas células através de transportadores de glicose (GluT) do tipo 2. Por ser uma nitrosamida metilnitrosureia ligada a uma D-glicose, uma vez metabolizada pela célula, gera N-nitrosureido, o qual causa a fragmentação do DNA celular, seguida da ativação de uma enzima de reparo, a poli-ADP-ribose-polimerase (PARP), a qual consome NAD<sup>+</sup> e favorece a formação de radicais livres que acabam promovendo a morte celular (HOSOKAWA; DOLCI; THORENS, 2001; SZKUDELSKI, 2001; UCHIGATA et al., 1982).

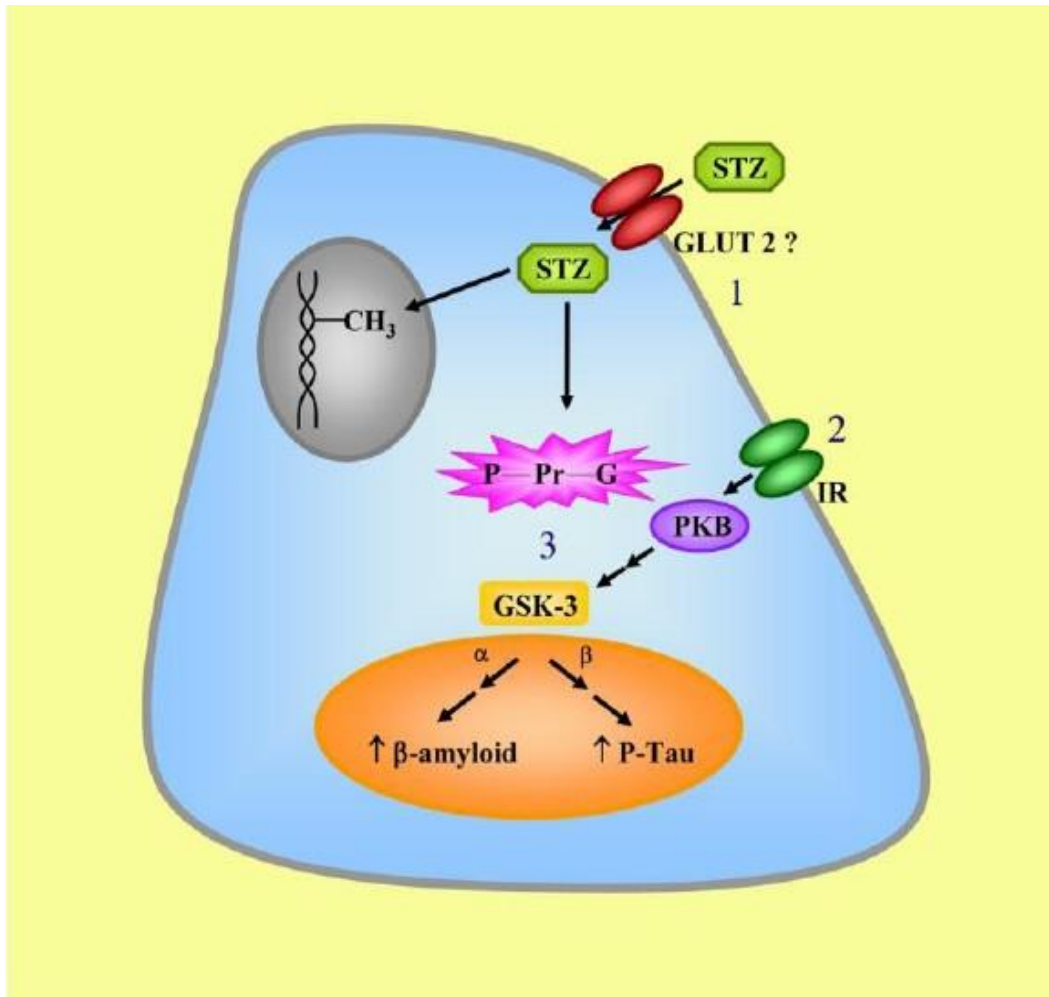
Este modelo tem sido amplamente aceito para experimentação relativa à DA (DE LA MONTE et al., 2009; HOYER et al., 2000; WEINSTOCK; SHOHAM, 2004). Quando administrada via ICV na dose de 1-3 mg/kg, a STZ causa uma espécie de dessensibilização dos receptores de insulina (RI) e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (ambos do tipo tirosina cinase), com consequentes alterações bioquímicas e fisiopatológicas semelhantes às encontradas na demência do tipo Alzheimer. De uma maneira resumida (figura 1), quando a insulina se liga ao seu receptor (tanto central quanto periférico), este recruta seu substrato (substrato do receptor de insulina - SRI) no sítio de ancoramento, tornando-o fosforilado nos resíduos de tirosina. Este, por sua vez, torna-se capaz de recrutar várias moléculas sinalizadoras, dentre estas a enzima fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K). Esta enzima fosforila o fosfoinotídeo da membrana que, por sua vez, ancora a proteína cinase B (PKB), também conhecida como Akt, a qual promove a translocação do transportador de glicose GluT 4 para a membrana plasmática, promovendo maior aporte de glicose nos tecidos dependentes de insulina.



Por outro lado, a Akt também modula por fosforilação a atividade da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK 3) a qual, dependendo de sua isoforma, regula os peptídeos  $\beta$ -amiloide (isoforma  $\alpha$ ) e a fosforilação da proteína tau (isoforma  $\beta$ ) (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2006; SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007). Além disso, o transportador de glicose 2, por onde a STZ entra nas células, está localizado em áreas específicas do encéfalo, como as áreas límbicas e seus núcleos relacionados (ARLUISON et al., 2004). Seu provável mecanismo de ação está ilustrado na figura 1. É importante ressaltar que a STZ não ultrapassa a barreira hematoencefálica e sua administração intracerebroventricular não causa comprometimento sistêmico (DUELLI et al., 1994; LANNERT; HOYER, 1998).

#### **4. Hormônios sexuais e o sistema nervoso central**

O encéfalo e as glândulas endócrinas estão em contínua comunicação para manter o equilíbrio de nosso organismo. A função encefálica é regulada por múltiplos sinais hormonais provindos de órgãos endócrinos do corpo. Da mesma maneira, o SNC regula a atividade das glândulas periféricas através da liberação de hormônios hipotalâmicos e da inervação de órgãos endócrinos.



**Figura 1:** Provável mecanismo de ação da STZ na célula (neurônio e/ou astrócito). 1. Entrada através do transportador de glicose 2 (GluT2) em neurônio ou astrócito, 2. Ação sobre o receptor de insulina (IR), 3. Consequente comprometimento da via da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK 3) por desequilíbrio da fosforilação/glicação de proteínas no neurônio. Adaptado de Rodrigues et al, 2011; Handbook of Journal of Alzheimer Disease (2011).

O encéfalo começa a vida como um elemento genérico, sem definição de macho ou fêmea, aguardando a chegada de algum perfil hormonal circulante, que será determinado pelas gônadas. O conceito de diferenciação sexual do encéfalo foi dado por Phoenix e colaboradores em 1959 (PHOENIX et al., 1959), onde se demonstrou que a administração pré-natal de testosterona é capaz de alterar a função encefálica permanentemente. Este estudo impulsionou tantas

outras pesquisas a respeito da influência dos hormônios esteroides sexuais no desenvolvimento do SNC, bem como no comportamento dos indivíduos a partir de suas ações.

Os hormônios esteroides gonadais são produzidos predominantemente, mas não exclusivamente, pelas gônadas – ovários e testículos. Eles exercem suas funções no SNC através da ligação a receptores específicos: testosterona (AR), progesterona (PR $\alpha$ , PR $\beta$ , PR $\gamma$ , PR $\delta$ , PR $\epsilon$ ) e estradiol (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), localizados tanto em neurônios quanto em células gliais (ACAZ-FONSECA et al., 2016). A relação entre dimorfismos sexuais e o número e a morfologia dos astrócitos tem sido amplamente estudada e detectada em diferentes regiões do SNC de roedores adultos, como: hipocampo, amígdala medial, área pré-óptica, núcleo arqueado, núcleo supraquiasmático, núcleo supraóptico, núcleo interpeduncular e cerebelo.

Há várias áreas do encéfalo que são conhecidas por serem diferentes em machos e fêmeas, como o núcleo ventromedial hipotalâmico e o núcleo leito da estria terminal, que apresentam um tamanho maior nos machos (MATSUMOTO; ARAI, 1983). Ambas as áreas estão envolvidas na regulação do comportamento sexual. Interessantemente, hipocampo e cerebelo não são áreas envolvidas no comportamento reprodutivo dos animais, mas também apresentam dimorfismo sexual. O hipocampo está envolvido com memória e orientação espacial, e orientação espacial em humanos parece estar correlacionada ao dimorfismo sexual. O cerebelo também é responsável por tarefas cognitivas, incluindo linguagem, memória de trabalho e processamento espacial (ALVAREZ et al., 2015; SCHMAHMANN, 2016)(Ito, 2008) e pacientes com DA apresentam alterações em sua estrutura e metabolismo (ALVAREZ et al., 2015;

SCHMAHMANN, 2016). Este tecido está envolvido em doenças como autismo e déficit de atenção, e isto leva a crer que também haja dimorfismo sexual (DEAN; MCCARTHY, 2008).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar alterações cognitivas e neuroquímicas em ratos submetidos ao modelo de demência induzido por administração intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ), **particularmente no que se refere à dependência temporal e de sexo.**

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar alterações cognitivas pelo teste de reconhecimento de objetos, em modelo animal de demência em ratos Wistar, de ambos os sexos, nos tempos 2, 4 e 8 semanas pós-administração ICV de STZ;
2. Estudar alterações metabólicas (captação de glicose, conteúdo de glutatona), colinérgicas (conteúdo de colina acetiltransferase) e astrogliais (conteúdo de GFAP e S100B) no hipocampo de ratos, de ambos os sexos, nos tempos 2, 4 e 8 semanas pós-administração ICV de STZ;
3. Avaliar as alterações neuroquímicas (metabólicas, colinérgicas e astrogliais) no cerebelo de ratos, de ambos os sexos, nos tempos 2, 4 e 8 semanas pós-administração ICV de STZ.
4. Investigar a ação do BDNF e do alto potássio sobre fatias hipocampais agudas (*ex vivo*) de ratos tratados com STZ via ICV.

## CAPÍTULO I

### **Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex**

Artigo publicado na revista *Behavioural Brain Research*.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

## Research report

## Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex



Regina Biasibetti, João Paulo Almeida dos Santos, Letícia Rodrigues, Krista Minéia Wartchow, Lucas Zingano Suardi, Patrícia Nardin, Nicholas Guerini Selistre, Dandara Vázquez, Carlos-Alberto Gonçalves\*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600-anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Alzheimer's disease (AD) has prevalence dependent on gender.
- We investigated alterations dependent on sex in a streptozotocin model of AD in rats.
- Hippocampal parameters were investigated 2, 4 and 8 weeks after streptozotocin.
- Cholinergic neurons and glucose uptake decrease were dependent on sex.
- S100B alteration in the hippocampus were also dependent on sex, but not GFAP.

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 May 2016

Received in revised form 24 August 2016

Accepted 28 August 2016

Available online 29 August 2016

## Keywords:

Alzheimer

Astrocyte

ChAT

Glucose uptake

Hippocampus

Sex

## ABSTRACT

The majority of Alzheimer's disease (AD) cases are sporadic and aging is the major risk factor for developing the disease, affecting more women than men. In spite of different gender prevalence, most experimental studies in animal models have been performed in male. This study investigates the streptozotocin (STZ)-induced AD model at three different times (2, 4 and 8 weeks afterwards) and in male and female rats, evaluating cognitive deficit, cholinergic neurotransmission, glucose uptake, glutathione content and specific glial markers (GFAP and S100B protein) in the hippocampus of the rat. Our data reinforce the relevance of alterations in STZ model of dementia, reported in the genesis and/or progression of AD such as cholinergic deficit and glucose uptake decrease. All alterations in these parameters (except GFAP) were dependent on sex. It is unclear, at this moment, which alterations are due to sex steroid modulation. In spite of limitations of this experimental model, these data may contribute to understand AD susceptibility and progression dependent on sex.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia, comprising 60–80% of the cases and is characterized by the memory loss and multiple cognitive dysfunctions [26]. The majority of AD cases are sporadic (about 95%) and aging seems to be the major non-genetic risk factor for the developing the disease, with the prevalence doubling every five years after the age of 65. It is possible to highlight other factors, such as life style, medical history,

level of education and gender [34]. There is a higher proportion of women suffering from AD than men [63].

These sex differences are likely to be mediated both via actions of sex steroid hormones, as well as by differences in neurochemical substrates between men and women. According to [35], several normal age-related changes significantly increase AD risk including (i) estrogen depletion associated with menopause, (ii) age-related decreases in testosterone in men, and (iii) increasing adiposity in men and women. Since both estrogen and testosterone regulate adiposity, there are possible interactions between sex steroid hormones, adiposity, and AD risk that may be expected to exhibit sex differences. This sex bias has also been studied in some mouse models of AD and female mice exhibited more aggressive senile plaque

\* Corresponding author: 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).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.057>

0166-4328/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

pathology compared to male mice. However, the molecular basis underlying this gender bias in mouse has not been fully solved.

There are many types of animal models to help us study and comprehend Alzheimer's disease. One of the non-transgenic models used for this aim is the intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ). When STZ is injected in both lateral ventricles, it provides a relevant model of chronic brain dysfunction that is characterized by long-term and progressive deficits in learning, memory, and cognitive behavior.

Histopathologically, the AD is characterized by extensive cortical neuronal loss (where cholinergic fibers in the hippocampus are early affected), presence of senile plaques and intracellular neurofibrillary tangles. In transgenic murine models of AD the cholinergic neurotransmission alterations are also more pronounced in the hippocampus [12]. It is also known that brain tissue from AD patients presents a solid disturbed metabolism of glucose – defective insulin signaling and oxidative stress [24,54]. Such alterations are found in STZ model of AD and are very useful to understand the mechanisms of disease.

We have used the STZ model of AD to test the neuroprotection of several compounds such as aminoguanidine [47], statins [58], antioxidants [4] as well as non-pharmacological strategies [48], such as physical exercise, focusing on astroglial parameters. In fact, our data reinforce the importance of astrocyte in the basis of AD, as well as therapeutic targets. Moreover considering the brain role of astrocytes, in health and disease, has been proposed that these cells are key elements to understanding the genesis of many neuropsychiatric disorders whose prevalence exhibit a gender-bias [13,51].

In spite of different gender prevalence pointed out in epidemiological studies, most experimental studies in animal models have been performed in male, and the effects of gender in a STZ-model of AD have not been examined. Therefore, the present study has been designed to investigate the STZ-induced AD model at three different times (2, 4 and 8 weeks after STZ administration) and in both genders, evaluating cognitive deficit, cholinergic neurotransmission, glucose uptake, glutathione content and specific glial markers in the hippocampus of the rat brain.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Streptozotocin, 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), *o*-phenylenediamine (OPD), *o*-phthalaldehyde (OPA), *meta*-phosphoric acid, sodium nitrate, nitrate reductase, *o*-phenylenediamine, and monoclonal anti-S100B antibody were purchased from Sigma. Anti-S100 antibody conjugated with peroxidase and anti-GFAP antibody were from Dako. Peroxidase secondary antibodies were from Amersham. All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

### 2.2. Animals

A total of a hundred and six, three to four-month-old, males and females Wistar rats weighing 300–400 g were obtained from our breeding colony (at the Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul), and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of  $22 \pm 1$  °C) with free access to food and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80–23) revised 1996, and following the regulations of the local animal house authorities.

Rats were divided into 2 groups: sham and STZ. After behavioral tasks, rats were anaesthetized, hippocampi were cut out from the brain and hippocampal slices prepared to glucose uptake assay or to be immediately frozen and stored at  $-80$  °C, aiming to evaluate S100B and GFAP contents, choline acetyltransferase (ChAT) and glutathione contents (GSH).

### 2.3. Surgical procedure

Streptozotocin was intracerebroventricularly infused, based on previous studies [4,47]. Briefly, on the day of the surgery animals were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively, i.p.) 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: 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 single bilateral infusion of 5  $\mu$ L STZ (3 mg/kg) or vehicle (Hank's balanced salt solution – HBSS – containing in mM: 137 NaCl; 0.63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4.17 NaHCO<sub>3</sub>; 5.36 KCl; 0.44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.26 CaCl<sub>2</sub>; 0.41 MgSO<sub>4</sub>; 0.49 MgCl<sub>2</sub> and 10 glucose, in pH 7.4) using a Hamilton syringe. After the surgical procedure, rats were placed on a heating pad to maintain body temperature at  $37.5 \pm 0.5$  °C and were kept there until recovery from anesthesia. The animals were submitted to behavioral tasks and biochemical analysis at 2, 4 and 8 weeks after STZ injection. A schematic representation of the experimental procedure is shown in Fig. 1, indicating times of surgery (STZ or vehicle infusion), cognitive behavior and biochemical analysis.

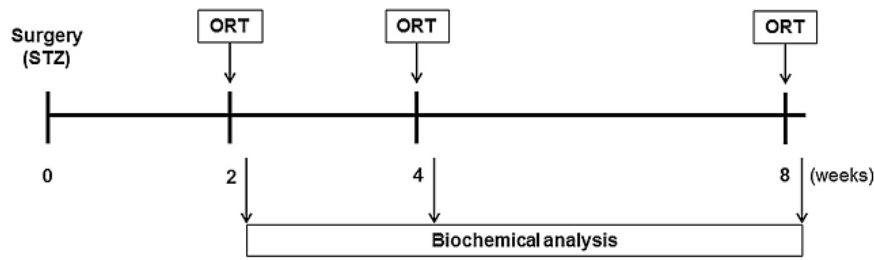
### 2.4. Cognitive evaluation

The object recognition test (ORT) is a simple behavioral assay of memory that primarily relies on a rodent's innate exploratory behavior in the absence of externally applied rules or reinforcement [6]. This task comprised three phases: habituation, training and test; each session had five-minute duration and was performed in an open field apparatus (50 cm side). To habituate the animals, rats were placed in the center of the apparatus and allowed to freely explore the open-field arena in the absence of objects. Twenty-four hours after the habituation phase, the animals underwent the training phase: the rat was returned to the apparatus that contained two identical sample objects (A + A). 2 h and 24 h after the training phase, the rats returned to the apparatus to test short-term (STM) or long-term (LTM) memory, respectively. In the test session, the rat was returned to the open-field arena that contained two objects; one object was identical to the training session and the other object was novel (A + B). For LTM, the object 'B' was replaced by a third one, and the 'A' object was maintained the same. The recognition index in each session was calculated as follows: time exploring the novel object/time exploring both objects. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. The apparatus and the objects were thoroughly cleaned with 90% ethanol between the trials to ensure the absence of olfactory cues.

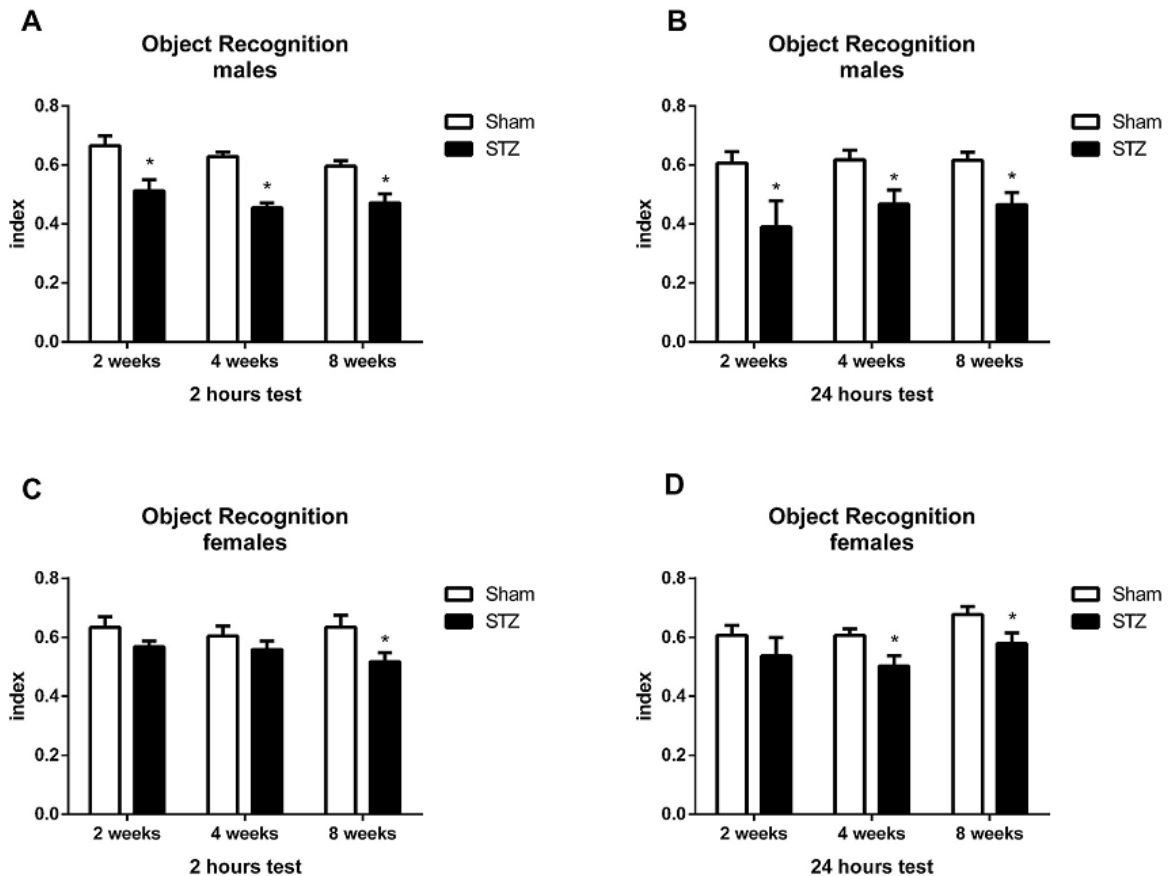
### 2.5. Quantification of S100B and GFAP

S100B content in the hippocampus was measured by ELISA [33]. Briefly, 50  $\mu$ L of sample plus 50  $\mu$ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.020 to 10 ng/mL. ELISA for GFAP [59] was carried out by coating the microtiter plate with 100  $\mu$ L samples containing 30  $\mu$ g of pro-





**Fig. 1.** Schematic representation of the experimental plan. Time is represented in weeks. Surgery corresponds to STZ or vehicle intracerebroventricular infusion; cognitive evaluation based on Object Recognition Test (ORT, see details in “Materials and methods” section); hippocampi were harvested for biochemical evaluation.



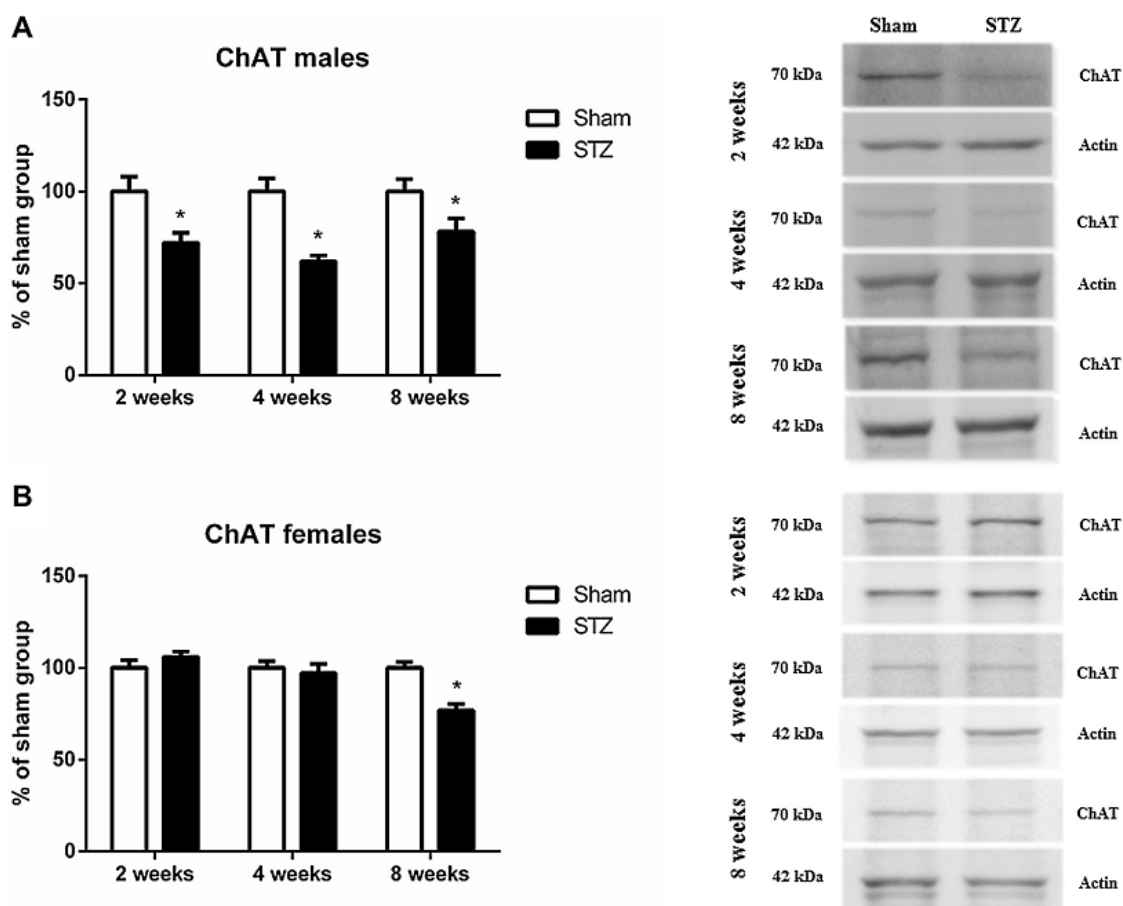
**Fig. 2.** Cognitive performance of rats submitted to ICV-STZ injection in different time points. STZ and sham animals were evaluated by novel recognition object test, 2 weeks, 4 weeks or 8 weeks after surgical procedure. (A) Object recognition index of the male rats 2 h after training trial. Each point represents the mean  $\pm$  standard error. \*Significant differences were detected by comparing STZ and sham group ( $N = 8-9$ , Student  $t$ -test,  $p < 0.05$ ); (B) Object recognition index of the male rats 24 h after training trial. Each point represents the mean  $\pm$  standard error. \*Significant differences were detected by comparing STZ and sham group ( $N = 8-9$ , Student  $t$ -test,  $p < 0.05$ ); (C) Object recognition index of the female rats 2 h after training trial. Each point represents the mean  $\pm$  standard error. \*Significant differences were detected by comparing STZ and sham group ( $N = 8-9$ , Student  $t$ -test,  $p < 0.05$ ); (D) Object recognition index of the female rats 24 h after training trial. Each point represents the mean  $\pm$  standard error. \*Significant differences were detected by comparing STZ and sham group ( $N = 8-9$ , Student's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ).

tein for 24 h at 4 °C. Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL.

## 2.6. GSH content

The glutathione content was determined as described before [8]. Briefly, hippocampal slices were homogenized and assayed

in phosphate-KCl buffer (20–140 mM, pH 7.4) containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% *meta*-phosphoric acid. Supernatant was assayed with *o*-phthaldialdehyde (1 mg/mL of 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 performed with standard glutathione solutions (0–500  $\mu$ M).



**Fig. 3.** Choline acetyltransferase (ChAT) content in hippocampus of rats submitted to ICV-STZ treatment. Male (A) and female (B) rats were submitted to ICV injection of STZ. Two, four or eight weeks later, hippocampi were dissected out and levels of ChAT were analyzed by western blotting and protein bands were quantified by densitometry. Values are mean  $\pm$  standard error. \*Significant difference between STZ and respective sham group (N = 8, Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).

### 2.7. Glucose uptake

Glucose uptake was measured in hippocampal slices. Briefly, slices were transferred to 24-well plates and incubated for 30 min at 37 °C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl<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, adjusted to pH 7.4. The assay was started by the addition of 0.1  $\mu$ Ci/mL [2,3-<sup>3</sup>H]deoxy-D-glucose. Incubation was stopped after 30 min by removal of the medium and rinsing the cells twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Non-specific uptake was determined by using 25  $\mu$ M cytochalasin B. Final glucose uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake of the total uptake to obtain the specific uptake.

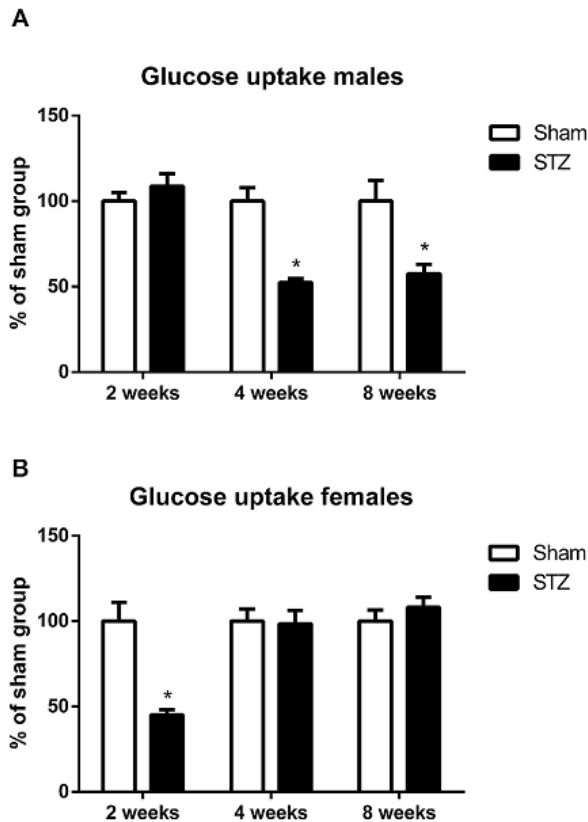
### 2.8. Western blotting

Proteins of sample 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% bromphenol blue) and separated by electrophoresis in 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) bovine serum

albumin (BSA) for 1 h at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated for 1 h with the appropriate primary antibody choline acetyltransferase (ChAT) (dilution 1:5000) EMD Millipore, and  $\beta$ -actin (dilution 1:2000) Sigma Aldrich, rinsed with TBS-T, and exposed to horseradish peroxidase-linked anti-IgG antibodies for 2 h at room temperature. Chemiluminescent bands were detected using ImageQuant LAS4000 GE Healthcare, and densitometry analyses were performed using Image-J software. The results were expressed as percentage of control.

### 2.9. Immunofluorescence assay

Rats were anesthetized using ketamine/xylazine and were perfused through the left cardiac ventricle with 200 mL of saline solution, followed by 200 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed and left for post-fixation in the same fixative solution at 4 °C for 24 h. Subsequently, the material was cryoprotected by immersing the brain in 30% sucrose in phosphate buffer at 4 °C [13]. The brains were sectioned (45  $\mu$ m) on a cryostat (Leitz) and the slices were put on the sheets. They were surrounded by a liquid blocker pen to help to maintain the antibody solutions in contact with the slices. Polyclonal anti-GFAP from rabbit, diluted 1:3000 and monoclonal anti-S100 (subunit  $\beta$ ) diluted 1:500 in 2% BSA and PBS-Triton X-100 0.4% were incubated for 48 h at 4 °C. After washing several



**Fig. 4.** Glucose uptake in hippocampal slices of rats submitted to ICV-STZ injection. Male (A) and female (B) rats were submitted to ICV injection of STZ. Two, four or eight weeks later, hippocampi were dissected out and the glucose uptake assay performed in acute hippocampal slices. Values are mean  $\pm$  standard error. \*Significant difference between STZ and respective sham group (N = 8–9, Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).

times, tissue sections were incubated with a secondary antibody (Alexa Fluor 568 A11011 anti-rabbit) diluted 1:500 in 2% BSA and PBS-Triton X-100 0.4%, at room temperature for 1 h. After washing several times, tissue sections were incubated with another secondary antibody (Alexa Fluor 488 anti-mouse) diluted 1:500 in 2% BSA and PBS-Triton X-100 0.4%, at room temperature for 1 h. Afterwards, the sections were covered with FluorGold and coverslips. Images were viewed with a confocal microscope and images transferred to a computer with digital camera.

#### 2.10. Protein determination

Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard.

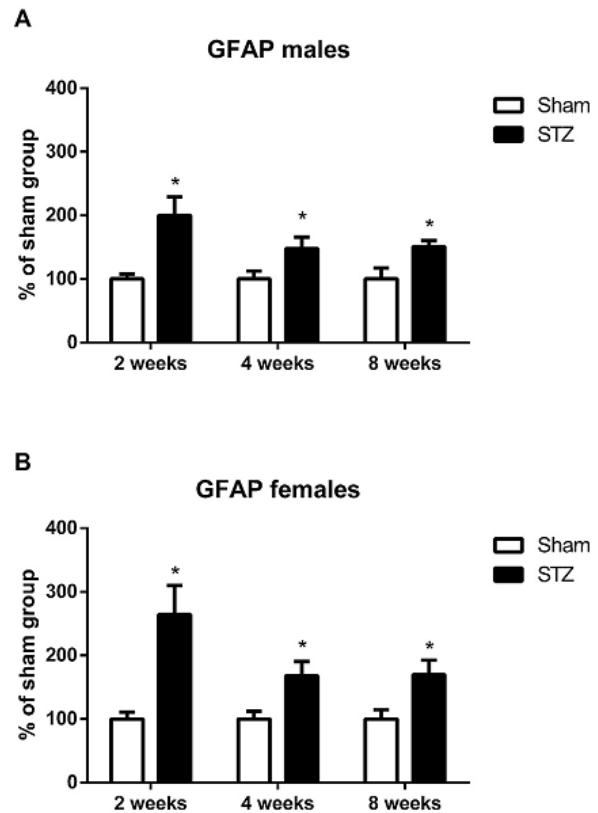
#### 2.11. Statistical analysis

Parametric data from the experiments were presented as means  $\pm$  standard error and statistically evaluated by Student's *t*-test at each time point, assuming  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. STZ treatment induced cognitive impairment

After two, four and eight weeks of STZ (or vehicle) injection, the object recognition test (ORT) was performed, aiming to evaluate



**Fig. 5.** GFAP content in hippocampus of rats submitted to ICV-STZ injection. Male (A) and female (B) rats were submitted to ICV injection of STZ. Two, four or eight weeks later, hippocampi were dissected out and levels of GFAP were measured by ELISA. Values are mean  $\pm$  standard error. \*Significant difference between STZ and sham group of the related time (N = 7–9, Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).

cognitive performance of male and female rats, both short and long-term memory. We found that males, on the three periods evaluated, presented a significant loss of short and long-term memory recognition (Fig. 2A and B). Females presented cognitive impairment in short memory only eight weeks after STZ-injection (Fig. 2C) and in long-term memory after four weeks of STZ-injection (Fig. 2D).

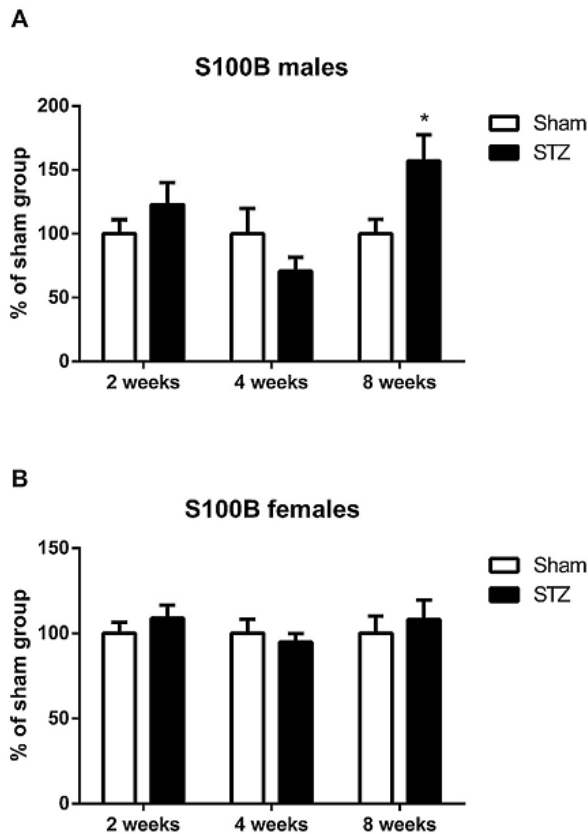
#### 3.2. STZ treatment reduced ChAT content

Choline acetyltransferase is an enzyme found in neurons responsible for acetylcholine synthesis. In males, we found decreased levels two, four and eight weeks after STZ infusion (Fig. 3A). In females, we found a significant decrease only eight weeks after STZ infusion (Fig. 3B).

#### 3.3. STZ treatment decreased glucose uptake

In order to evaluate glucose metabolism, we performed glucose uptake assay, from fresh slices from hippocampus. Basal values of glucose uptake in sham group were lower in male (mean = 8.9 nmol/mg prot/min) than in female rats (mean = 14.0 nmol/mg prot/min).

Moreover, a significant difference was observed in males treated with STZ, four and eight weeks after infusion (Fig. 4A). On contrary, in females, we found a significant and transient decrease only two weeks after STZ infusion (Fig. 4B).



**Fig. 6.** S100B content in hippocampus of rats submitted to ICV-STZ injection. Male (A) and female (B) rats were submitted to ICV injection of STZ. Two, four or eight weeks later, hippocampi were dissected out and levels of S100B were measured by ELISA. Values are mean  $\pm$  standard error. \*Significant difference between STZ and sham group of the related time (N = 7–9, Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).

#### 3.4. STZ treatment activated hippocampal astrocytes

Astrocyte activation after STZ treatment was evaluated by changes in the contents of GFAP and S100B protein. We observed that GFAP content was elevated in males (Fig. 5A) and females (Fig. 5B), which received STZ treatment in all time points. However, S100B was elevated in males, at eight weeks after STZ-injection (Fig. 6A). Moreover, no changes were observed in S100B levels of female rats treated with STZ (Fig. 6B). Fig. 7 shows representative images of immunofluorescence to GFAP and S100B proteins in CA1 region of hippocampus of males. The differences between sham and STZ groups can clearly be observed, four and eight weeks after STZ injection.

#### 3.5. STZ treatment decreased levels of glutathione

In order to evaluate a possible oxidative imbalance in hippocampus, we measured reduced glutathione levels, whose synthesis and recycling is dependent on astrocyte activity. We found decreased levels of GSH four weeks after STZ administration in males (Fig. 8A) and females (Fig. 8B) rats. However, this alteration was transient in females and persistent in male rats, based on the measurement carried out at eight weeks.

## 4. Discussion

In this study, we observed that alterations in the cognitive performance and neurochemical parameters in hippocampus of rats submitted to ICV-STZ administration were dependent on sex. This model of Alzheimer's disease (AD) is largely used to study insulin signaling impairment previous to beta-amyloid deposition and to test novel therapeutic approaches [18,55]. Our results show that alterations in this model are dependent on time, and mainly, are dependent on sex. Therefore, these results may help to understand better this dementia model and to spell out some aspects dependent on gender in Alzheimer's disease.

It is a fact that more women have AD, and some reviews raise some possible explanations for that [e.g. [3,46,63]] including that: women live longer than men and thus comprise most of the elderly population; men get more vascular dementia, which would reduce the likelihood of being diagnosed with pure Alzheimer's disease by masking early symptoms; men with AD die faster than women with AD; in some studies, a low level of education has been associated with a greater risk of developing AD and, generally, more men had access to education; the testosterone levels are higher in men, and this showed to be positively associated with cognitive function.

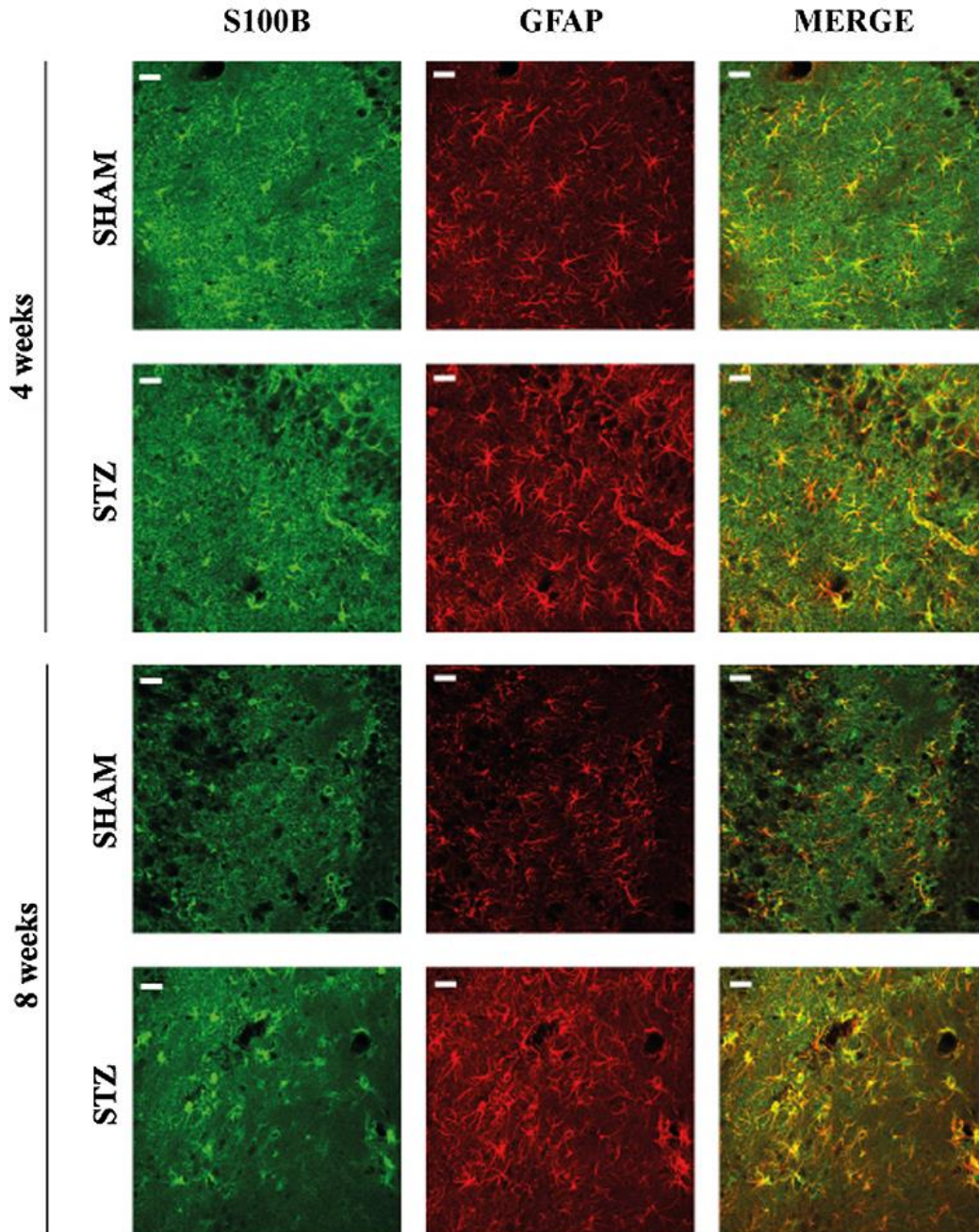
The effects of hippocampal damage on recognition memory in rats have typically been assessed using visual or object recognition memory tasks [9]. The object recognition test (ORT) is a non-spatial memory test that relies on a rat's innate explorative behavior [1]. We found a significant cognitive impairment in the male groups treated with STZ, in the three times evaluated both short and long-term memory were affected. Female rats seem to be more resistant to STZ effects, especially in the first's weeks after injection.

Pioneer works suggest that estrogen could mediate the resistance to brain STZ lesion observed in female rats [30,64]. However, recent studies demonstrate that androgens also exert neuroprotective on ICV-STZ model of dementia [37,52]. It is important to mention that aromatase, the enzyme that catalysis estradiol synthesis from testosterone appears to be affected by STZ treatment, and male STZ-diabetic rats exhibited a decrease of blood testosterone levels and concomitant increase of estradiol, due to a non-gonadal increase of aromatase activity [42]. An aromatase inhibition of hippocampal neurons, i.e. decrease of local estradiol, results in synapse loss specifically in females, but not in males [62]. ICV-STZ effect on hippocampal aromatase has not been reported. Regardless, the hippocampal resistance to ICV-STZ in female rats observed here surely involve sex steroid signaling, but it is more complex than a manicheistic view – more estrogen or less testosterone.

More than 20 years ago was hypothesized that estradiol, by its trophic effect for basal forebrain cholinergic neurons, could be useful to reduce AD risk [17]. In fact, cholinergic system is one of the most affected on AD patients and cholinesterase inhibitors are currently being used for symptomatic treatment [16] and these inhibitors are useful in particular AD patients individuals characterized by age and gender [29].

The decrease of ChAT activity has been reported in AD patients e.g. [25]. However, other ChAT markers such as ChAT gene expression [53] or ChAT protein expression [39] have been used to evaluate cholinergic and cognitive deficits in AD models. Moreover, acetylcholine deficit due to the increase of acetyl cholinesterase and butyryl cholinesterase (from astrocytes) activities have also been investigated in AD [11]. In a previous work we have found a decrease of AChE in STZ-model of AD [4].

Herein, we found a significant decrease in hippocampal ChAT levels in the STZ group. In male group, these findings are consistent with previous works [15,27]. Female rats exhibited a decrease of ChAT only at 8 weeks after STZ administration. In hippocampus, cholinergic system mediates, in part, the ability of estrogens



**Fig. 7.** Astrocytes in hippocampus were activated by ICV-STZ injection. Representative confocal images of GFAP- and S100B-positive astrocytes in hippocampus of male rats, four and eight weeks after injection. Scale bar = 25  $\mu$ m.

to impact cognition [10,50]. Estradiol affects protein expression and activity of ChAT [5,22,41] and, therefore, we think that the resistance to STZ damage cholinergic system (i.e. ChAT decrease) in females is mediated by estradiol.

Other neurochemical aspect strongly affected in AD is the glucose metabolism [24], including glucose transport and glycolysis, whose are well known targets of estradiol modulation [45]. A study with 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG PET) in healthy subjects to evaluate the effects of sex show that cerebral glucose metabolism

in women was higher than in men [66]. In rats we found a similar profile looking at glucose uptake measured using [ $^3$ H]deoxy-D-glucose in *ex vivo* hippocampal slices, and this is in agreement with a sexually-dimorphic expression of glucose transporters in brain and well pronounced in hippocampus [28]. The sex dependent resistance to ICV-STZ is clear: females were more sensitive to damage, but transiently affected.

Specific glial changes often precede formation of histopathological signals of AD [19,38,60] and these alterations are maintained

throughout the progression of the disease [49]. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a well-known marker of reactive astrocytes. Other works using ICV-STZ model for AD have shown GFAP increment in hippocampus [43,44]. We found a clear augmentation of GFAP both in males and females, after two weeks, which persisted at four and eight weeks after STZ infusion. We did not find sex dependent changes in the GFAP increment in STZ-model of AD, but this protein has its expression dependent on sex [67] and estradiol is a well-known regulator [21].

Other astrocyte protein evaluated in AD is the S100B. This protein is secreted by astrocytes and it has been proposed as modulatory role in neuroinflammation and neurodegenerative diseases, including AD [14,65]. Moreover, intracellularly S100B could modulate calcineurin [32], a key phosphatase in the inflammatory response in astrocyte [20]. In agreement, S100B increments in AD have been described in astrocytes around amyloid plaques [36]. In other works, we have identified reduced levels of S100B in CSF in dementia models induced by ICV-STZ [4,47,58], ICV-okadaic acid [7] and chronic brain hypoperfusion [61]. In our study we observed a late hippocampal S100B increment (compared with GFAP increment) only in male rats. Recently we have reported sex dependent expression of S100B in hippocampus in a model of schizophrenia induced by prenatal exposure to LPS [13].

A signal of astrocyte dysfunction is the decrease of reduced glutathione [56]. In this ICV-STZ model of AD we found a decrease of GSH that was transient in female rats. Three enzymes glutathione-S-transferase (involved in synthesis of GSH), glutathione peroxidase (involved in the defense against superoxide) and glutathione reductase (involved in the recycling of glutathione) are sensitive to sex steroids [40].

Overall, our data using ICV-STZ model of AD, pointed out that female rats are more resistant to the induced alterations. The higher resistance of female rats to ICV-STZ damage emphasize the importance of sex dependence in brain response to injury. These apparently contrast to higher susceptibility of women to develop AD. However, it is important to mention some limitations in this study. Firstly, in this experimental model, we are looking for alterations before amyloid phase of AD, and most of human studies on AD are conducted when the disease is established [31]. Secondly, we looked for neurochemical alterations in mature (not old) and fertile animals that eventually could exhibit changes sexually-dimorphic to ageing [2]. Finally, only one cognition task (ORT) was carried out to evaluate sex dependence in this model of dementia. Other cognitive tasks could reinforce our finding [23,57].

## 5. Conclusions

Our data reinforce the relevance of alterations in ICV-STZ model of dementia, reported in the genesis and/or progression of AD such as cholinergic deficit and glucose uptake decrease. Other alterations (GFAP, S100B and GSH) stress the astrocyte involvement in this AD model. All alterations in these parameters (except GFAP) were dependent on sex. It is unclear, at this moment, how much of these alterations are due to sex steroid modulation of these parameters. In spite of limitations of our ICV-STZ model above mentioned, these data may contribute to understand AD susceptibility and progression dependent on sex.

## 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).

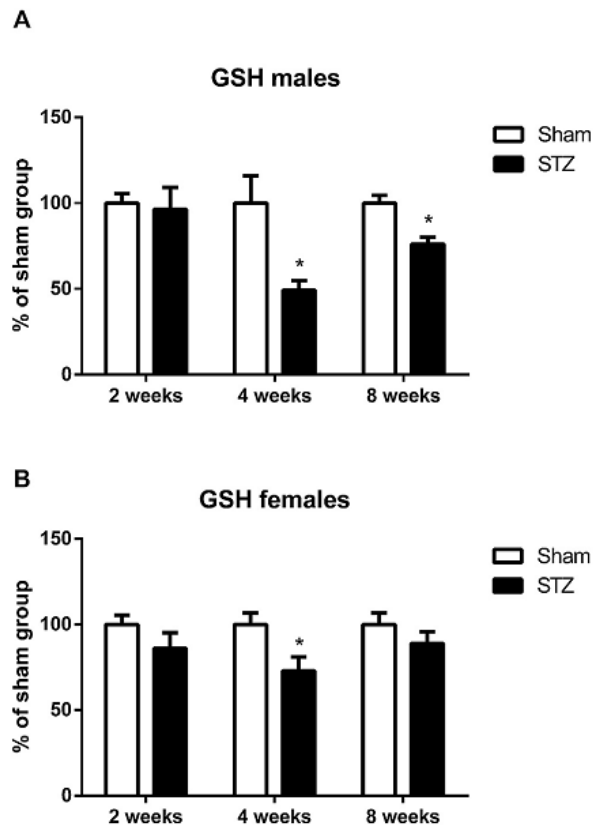


Fig. 8. Glutathione levels in hippocampus of rats submitted to ICV-STZ injection. Male (A) and female (B) rats were submitted to ICV injection of STZ. Two, four or eight weeks later, hippocampi were dissected out and levels of S100B were measured by ELISA. Values are mean  $\pm$  standard error. \*Significant difference between STZ and sham group of the related time (N = 6–8, Student's t-test,  $p < 0.05$ ).

## References

- M. Antunes, G. Biala, The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications, *Cogn. Process* 13 (2012) 93–110, <http://dx.doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>.
- T.L. Bale, C.N. Epperson, Sex differences and stress across the lifespan, *Nat. Neurosci.* 18 (2015) 1413–1420, <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4112>.
- L.V. Baum, Sex, hormones, and Alzheimer's disease, *J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci.* 60 (2005) 736–743.
- R. Biasibetti, A.C. Tramontina, A.P. Costa, M.F. Dutra, A. Quincozes-Santos, P. Nardin, C.L. Bernardi, K.M. Wartchow, P.S. Lunardi, C.-A. Gonçalves, Green tea (–)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia, *Behav. Brain Res.* 236 (2013) 186–193, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.039>.
- J. Bohacek, A.M. Bearl, J.M. Daniel, Long-term ovarian hormone deprivation alters the ability of subsequent oestradiol replacement to regulate choline acetyltransferase protein levels in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats, *J. Neuroendocrinol.* 20 (2008) 1023–1027, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01752.x>.
- M. Borsoi, C.B. Antonio, A.F. Viana, P. Nardin, C.-A. Gonçalves, S.M.K. Rates, Immobility behavior during the forced swim test correlates with BDNF levels in the frontal cortex, but not with cognitive impairments, *Physiol. Behav.* 140 (2015) 79–88, <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.12.024>.
- N. Broetto, F. Hansen, G. Brolese, C. Batassini, F. Lirio, F. Galland, J.P.A.D. Santos, M.F. Dutra, C.-A. Gonçalves, Intracerebroventricular administration of okadaic acid induces hippocampal glucose uptake dysfunction and tau phosphorylation, *Brain Res. Bull.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.014>.
- R.W. Browne, D. Armstrong, Reduced glutathione and glutathione disulfide, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 108 (1998) 347–352, <http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-472-0:347>.
- R.E. Clark, S.M. Zola, L.R. Squire, Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20 (2000) 8853–8860.

- [10] J.M. Daniel, G.P. Dohanich, Acetylcholine mediates the estrogen-induced increase in NMDA receptor binding in CA1 of the hippocampus and the associated improvement in working memory, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21 (2001) 6949–6956.
- [11] S. Darvesh, R. Walsh, R. Kumar, A. Caines, S. Roberts, D. Magee, K. Rockwood, E. Martin, Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17 (2003) 117–126.
- [12] L. Descarries, N. Aznavour, E. Hamel, The acetylcholine innervation of cerebral cortex: new data on its normal development and its fate in the hAPP(SW, IND) mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neural Transm. Vienna Aus.* 1996 (112) (2005) 149–162, <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-004-0186-z>.
- [13] D.F. de Souza, K.M. Wartchow, P.S. Lunardi, G. Brolese, L.S. Tortorelli, C. Batassini, R. Biasibetti, C.-A. Gonçalves, Changes in astroglial markers in a maternal immune activation model of schizophrenia in wistar rats are dependent on sex, *Front. Cell Neurosci.* 9 (2015) 489, <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00489>.
- [14] R. Donato, G. Sorci, F. Ruzzi, C. Arcuri, R. Bianchi, F. Brozzi, C. Tubaro, I. Giambanco, S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 1008–1022, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.009>.
- [15] M. Ejaz Ahmed, M.M. Khan, H. Javed, K. Vaibhav, A. Khan, R. Tabassum, M. Ashafaq, F. Islam, M.M. Safhi, F. Islam, Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type, *Neurochem. Int.* 62 (2013) 492–501, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.006>.
- [16] J.M. Ellis, Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia, *J. Am. Osteopath. Assoc.* 105 (2005) 145–158.
- [17] E.B. Engler-Chiurazzi, M. Singh, J.W. Simpkins, From the 90's to now: a brief historical perspective on more than two decades of estrogen neuroprotection, *Brain Res.* 1633 (2016) 96–100, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.044>.
- [18] J. Espinosa, A. Rocha, F. Nunes, M.S. Costa, V. Schein, V. Kazlauckas, E. Kalinine, D.O. Souza, R.A. Cunha, L.O. Porciúncula, Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia, *J. Alzheimers Dis.* 34 (2013) 509–518, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-111982>.
- [19] S. Fuller, G. Münch, M. Steele, Activated astrocytes: a therapeutic target in Alzheimer's disease? *Expert Rev. Neurother.* 9 (2009) 1585–1594, <http://dx.doi.org/10.1586/ern.09.111>.
- [20] J.L. Furman, C.M. Norris, Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond, *J. Neuroinflammation* 11 (2014) 158, <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-014-0158-7>.
- [21] L.M. Garcia-Segura, I. Torres-Aleman, F. Naftolin, Astrocytic shape and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity are modified by estradiol in primary rat hypothalamic cultures, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 47 (1989) 298–302.
- [22] R.B. Gibbs, Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function, *Neuroscience* 101 (2000) 931–938.
- [23] M. Gulinello, M. Gertner, G. Mendoza, B.P. Schoenfeld, S. Oddo, F. LaFerla, C.H. Choi, S.M.J. McBride, D.S. Faber, Validation of a 2-day water maze protocol in mice, *Behav. Brain Res.* 196 (2009) 220–227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.002>.
- [24] S. Hoyer, Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease, *Eur. J. Pharmacol.* 490 (2004) 115–125, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.049>.
- [25] M.D. Ikonomic, E.J. Mufson, J. Wu, D.A. Bennett, S.T. DeKosky, Reduction of choline acetyltransferase activity in primary visual cortex in mild to moderate Alzheimer's disease, *Arch. Neurol.* 62 (2005) 425–430, <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.62.3.425>.
- [26] K. Iqbal, X. Wang, J. Blanchard, F. Liu, C.-X. Gong, I. Grundke-Iqbal, Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration: pivotal and multifactorial, *Biochem. Soc. Trans.* 38 (2010) 962–966, <http://dx.doi.org/10.1042/BST0380962>.
- [27] T. Ishrat, M.N. Hoda, M.B. Khan, S. Yousuf, M. Ahmad, M.M. Khan, A. Ahmad, F. Islam, Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT), *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19 (2009) 636–647, <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.02.002>.
- [28] S.D. Kelly, C.S. Harrell, G.N. Neigh, Chronic stress modulates regional cerebral glucose transporter expression in an age-specific and sexually-dimorphic manner, *Physiol. Behav.* 126 (2014) 39–49, <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.12.002>.
- [29] R.M. Lane, T. Darreh-Shori, Understanding the beneficial and detrimental effects of donepezil and rivastigmine to improve their therapeutic value, *J. Alzheimers Dis.* 44 (2015) 1039–1062, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-142268>.
- [30] H. Lannert, P. Wirtz, V. Schuhmann, R. Galmbacher, Effects of Estradiol (-17beta) on learning, memory and cerebral energy metabolism in male rats after intracerebroventricular administration of streptozotocin, *J. Neural Transm. Vienna Aus.* 1996 (105) (1998) 1045–1063, <http://dx.doi.org/10.1007/s007020050111>.
- [31] K.R. Laws, K. Irvine, T.M. Gale, Sex differences in cognitive impairment in Alzheimer's disease, *World J. Psychiatry* 6 (2016) 54–65, <http://dx.doi.org/10.5498/wjp.v6.i1.54>.
- [32] R.B. Leal, J.K. Frizzo, F. Tramontina, S. Fieuw-Makaroff, L. Bobrovskaya, P.R. Dunkley, C.-A. Gonçalves, S100B protein stimulates calcineurin activity, *Neuroreport* 15 (2004) 317–320.
- [33] M.C. Leite, F. Galland, G. Brolese, M.C. Guerra, J.W. Bortolotto, R. Freitas, L.M.V. de Almeida, C. Gottfried, C.-A. Gonçalves, A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein, *J. Neurosci. Methods* 169 (2008) 93–99, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.021>.
- [34] I. McDowell, Alzheimer's disease: insights from epidemiology, *Aging Milan Italy* 13 (2001) 143–162.
- [35] V.A. Moser, C.J. Pike, Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease, *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.08.021>.
- [36] R.E. Mrak, J.G. Sheng, W.S. Griffin, Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55 (1996) 273–279.
- [37] A.M. Nayebi, S. Pourrabi, S. Hossini, Testosterone ameliorates streptozotocin-induced memory impairment in male rats, *Acta Pharmacol. Sin.* 35 (2014) 752–757, <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2014.6>.
- [38] M. Orre, W. Kamphuis, L.M. Osborn, A.H.P. Jansen, L. Kooijman, K. Bossers, E.M. Hol, Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction, *Neurobiol. Aging* 35 (2014) 2746–2760, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>.
- [39] E. Orta-Salazar, C.A. Cuellar-Lemus, S. Diaz-Cintra, A.I. Feria-Velasco, Cholinergic markers in the cortex and hippocampus of some animal species and their correlation to Alzheimer's disease, *Neurol. Barc. Spain* 29 (2014) 497–503, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2012.10.007>.
- [40] S.B. Pajović, Z.S. Sačić, Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones, *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 57 (2008) 801–811.
- [41] S.E. Ping, J. Trieu, M.E. Wlodek, G.L. Barrett, Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons and spatial learning, *J. Neurosci. Res.* 86 (2008) 1588–1598, <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21609>.
- [42] A. Prabhu, Q. Xu, M.B. Manigrasso, M. Biswas, E. Flynn, R. Ilescu, E.D. Lephart, C. Maric, Expression of aromatase, androgen and estrogen receptors in peripheral target tissues in diabetes, *Steroids* 75 (2010) 779–787, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2009.12.012>.
- [43] J. Prickaerts, T. Fahrig, A. Blokland, Cognitive performance and biochemical markers in septum: hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis, *Behav. Brain Res.* 102 (1999) 73–88.
- [44] S. Rai, P.K. Kamat, C. Nath, R. Shukla, Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 117 (2014) 104–117, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.035>.
- [45] J.R. Rettberg, J. Yao, R.D. Brinton, Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body, *Front. Neuroendocrinol.* 35 (2014) 8–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ynfrn.2013.08.001>.
- [46] B.C. Riedel, P.M. Thompson, R.D. Brinton, Age, APOE and sex: triad of risk of Alzheimer's disease, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2016.03.012>.
- [47] L. Rodrigues, R. Biasibetti, A. Swarowsky, M.C. Leite, A. Quincozes-Santos, J.A. Quilfeldt, M. Achaval, C.-A. Gonçalves, Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine, *J. Alzheimers Dis.* 17 (2009) 193–202, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2009-1034>.
- [48] L. Rodrigues, M.F. Dutra, J. Ilha, R. Biasibetti, A. Quincozes-Santos, M.C. Leite, S. Marcuzzo, M. Achaval, C.-A. Gonçalves, Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin, *J. Neural Transm. Vienna Aus.* 1996 (117) (2010) 1295–1305, <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-010-0501-9>.
- [49] J.J. Rodríguez-Arellano, V. Parpura, R. Zorec, A. Verkhratsky, Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease, *Neuroscience* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007>.
- [50] C.N. Rudick, R.B. Gibbs, C.S. Woolley, A role for the basal forebrain cholinergic system in estrogen-induced disinhibition of hippocampal pyramidal cells, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23 (2003) 4479–4490.
- [51] J.M. Schwarz, S.D. Bilbo, Sex, glia, and development: interactions in health and disease, *Horm. Behav.* 62 (2012) 243–253, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.018>.
- [52] P. Seyedreza, M.N. Alireza, H. Seyedebrahim, Role of testosterone in memory impairment of Alzheimer disease induced by Streptozotocin in male rats, *Daru J. Fac. Pharm. Tehran Univ. Med. Sci.* 20 (2012) 98, <http://dx.doi.org/10.1186/2008-2231-20-98>.
- [53] K. Shin, H. Guo, Y. Cha, Y.-H. Ban, D.W. Seo, Y. Choi, T.-S. Kim, S.-P. Lee, J.-C. Kim, E.-K. Choi, J.-M. Yon, Y.-B. Kim, CereboostTM, an American ginseng extract, improves cognitive function via up-regulation of choline acetyltransferase expression and neuroprotection, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 78 (2016) 53–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.04.006>.
- [54] G.S. Smith, M.J. de Leon, A.E. George, A. Kluger, N.D. Volkow, T. McRae, J. Golomb, S.H. Ferris, B. Reisberg, J. Ciaravino, Topography of cross-sectional and longitudinal glucose metabolic deficits in Alzheimer's disease, *Pathophysiol. Implications Arch. Neurol.* 49 (1992) 1142–1150.
- [55] J. Song, B.E. Hur, K.K. Bokara, W. Yang, H.J. Cho, K.A. Park, W.T. Lee, K.M. Lee, J.E. Lee, Agmatine improves cognitive dysfunction and prevents cell death in a streptozotocin-induced alzheimer rat model, *Yonsei Med. J.* 55 (2014) 689–699, <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2014.55.3.689>.
- [56] M.L. Steele, S.R. Robinson, Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 33 (423) (2012) e1–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.018>.

- [57] K.R. Stover, M.A. Campbell, C.M. Van Winssen, R.E. Brown, Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.* 289 (2015) 29–38, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.012>.
- [58] A.C. Tramontina, K.M. Wartchow, L. Rodrigues, R. Biasibetti, A. Quincozes-Santos, L. Bobermin, F. Tramontina, C.-A. Gonçalves, The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats, *J. Neural Transm. Vienna Aus.* 1996 (118) (2011) 1641–1649, <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-011-0680-z>.
- [59] F. Tramontina, M.C. Leite, K. Cereser, D.F. de Souza, A.C. Tramontina, P. Nardin, A.C. Andrezza, C. Gottfried, F. Kapczinski, C.-A. Gonçalves, Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state, *J. Neurosci. Methods* 162 (2007) 282–286, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.01.001>.
- [60] A. Verkhatsky, M. Olabarria, H.N. Noristani, C.-Y. Yeh, J.J. Rodriguez, Astrocytes in Alzheimer's disease, *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7 (2010) 399–412, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.017>.
- [61] E. Vicente, D. Degerone, L. Bohn, F. Scornavaca, A. Pimentel, M.C. Leite, A. Swarowsky, L. Rodrigues, P. Nardin, L.M.V. de Almeida, C. Gottfried, D.O. Souza, C.A. Netto, C.A. Gonçalves, Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat, *Brain Res.* 1251 (2009) 204–212, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.032>.
- [62] R. Vierk, N. Brandt, G.M. Rune, Hippocampal estradiol synthesis and its significance for hippocampal synaptic stability in male and female animals, *Neuroscience* 274 (2014) 24–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.003>.
- [63] J. Viña, A. Lloret, Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide, *J. Alzheimers Dis.* 20 (Suppl. 2) (2010) S527–533, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2010-100501>.
- [64] M. Weinstock, S. Shoham, Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity, *J. Neural Transm. Vienna Aus.* 1996 (111) (2004) 347–366, <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-003-0058-y>.
- [65] D.M. Wilcock, W.S.T. Griffin, Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis, *J. Neuroinflammation* 10 (2013) 84, <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-10-84>.
- [66] H. Yoshizawa, Y. Gazes, Y. Stern, Y. Miyata, S. Uchiyama, Characterizing the normative profile of 18F-FDG PET brain imaging: sex difference, aging effect, and cognitive reserve, *Psychiatry Res.* 221 (2014) 78–85, <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2013.10.009>.
- [67] G.K.H. Zupanc, I. Ilies, R.F. Sîrbulescu, M.M. Zupanc, Large-scale identification of proteins involved in the development of a sexually dimorphic behavior, *J. Neurophysiol.* 111 (2014) 1646–1654, <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00750.2013>.



## **CAPÍTULO II**

### **Alterações cerebelares no modelo animal de Doença de Alzheimer esporádica são diferentes em machos e fêmeas**

No capítulo I investigamos as ações da estreptozotocina no hipocampo de machos e fêmeas, duas, quatro e oito semanas após sua infusão. Por uma opção didática, resolvemos não incluir no artigo científico os resultados encontrados em cerebelo. Ressaltamos que, por ser um tecido pouco afetado primariamente na doença de Alzheimer, o cerebelo não é foco de estudos relacionados a esta doença, mas, por também ser descrito como um tecido de dimorfismo sexual e termos encontrado resultados surpreendentes, julgamos importante apresentá-los aqui.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Animais**

Cento e oito ratos Wistar (machos e fêmeas), de 3 a 4 meses de idade, pesando de 300 a 400 gramas foram obtidos da colônia de reprodução do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Eram mantidos em ambiente com luz e temperatura controladas (ciclo 12 horas claro/12 horas escuro, temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) tendo livre acesso à água e comida. O controle do ciclo estral das ratas foi realizado e foi encontrada uma distribuição homogênea, tanto nos dias de testes comportamentais quanto nos dias de eutanásia e dosagens bioquímicas. Todos os procedimentos de experimentação animal foram realizados conforme a legislação vigente e o

projeto de número 23571 teve aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade.

Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos: sham e STZ. Um terço dos animais sofreu eutanásia duas semanas após a infusão de STZ, outro quatro semanas após e outro oito semanas após. Depois de realizar as tarefas comportamentais (relatadas no capítulo I), os animais foram eutanasiados, o cerebelo foi removido e fatiado e algumas fatias foram destinadas à dosagem de captação de glicose. As demais foram imediatamente congeladas em *freezer* - 80°C para posterior análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: proteínas S100B, GFAP e colina acetiltransferase e GSH.

## 2. Procedimento cirúrgico

A STZ foi infundida nos ventrículos laterais, conforme trabalhos anteriores (BIASIBETTI et al., 2013). No dia da cirurgia, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (75 e 10 mg/kg, respectivamente, intraperitoneal) e posicionados em aparelho estereotáxico. Uma incisão medial foi feita no couro cabeludo. Os ventrículos laterais foram acessados de acordo com as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior ao bregma; 1,5 mm lateral à sutura sagital; 3,6 mm dorso-ventral. Para perfurar o crânio, fez-se uso de uma broca. Após posicionar a agulha conforme as coordenadas, 5 µL de STZ (3 mg/kg) ou veículo (*Hank's balanced salt solution* – HBSS – que contém em mM: 137 NaCl; 0,63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,17 NaHCO<sub>3</sub>; 5,36 KCl; 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,26 CaCl<sub>2</sub>; 0,41 MgSO<sub>4</sub>; 0,49 MgCl<sub>2</sub> e 10 de glicose, pH 7,4) foram infundidos em cada ventrículo usando uma seringa Hamilton. Após o procedimento cirúrgico, os(as) ratos(as) foram colocados sobre uma placa de aquecimento (37,5 ± 0,5°C) e foram mantidos ali

até se recuperarem da anestesia. Os animais foram submetidos às análises bioquímicas duas, quatro e oito semanas após a injeção de STZ ou veículo.

### 3. Quantificação de S100B e GFAP

O imunoconteúdo de S100B no cerebelo foi medido por ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), conforme (LEITE et al., 2008). Brevemente, o tecido foi homogeneizado e 50 µL de amostra mais 50 µL de tampão Tris foram incubados por duas horas em uma placa de microtitulação previamente revestida de anticorpo monoclonal anti-S100B. O anticorpo policlonal anti-S100B e o anticorpo *anti-rabbit* conjugado à peroxidase foram incubados por uma hora. Uma reação colorimétrica com o-fenilenodiamina foi medida em 492 nm. A curva-padrão de S100B variou de 0,020 a 10 ng/mL. ELISA para GFAP (TRAMONTINA et al., 2007) foi realizado revestindo-se uma placa de microtitulação com 80 µL do tecido previamente homogeneizado e diluído por 24 h a 4°C. A incubação com anticorpo policlonal *anti-rabbit* anti-GFAP foi feita por uma hora e foi seguida da incubação com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase por uma hora a temperatura ambiente; a curva-padrão de GFAP variou de 0,1 a 10 ng/mL.

### 4. Quantificação de glutatona

O conteúdo de glutatona foi determinado de acordo com (BROWNE; ARMSTRONG, 1998). Brevemente, as fatias cerebelares foram homogeneizadas em tampão fosfato-KCl (20-140 mM, pH 7,4) contendo 5 mM de EDTA e as proteínas foram precipitadas com a adição de ácido meta-fosfórico 1,7%. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se o-ftaldialdeído (1 mg/mL em metanol) a temperatura ambiente por 15 minutos. A fluorescência foi medida

usando os comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi feita, com solução-padrão de glutationa (0–500  $\mu$ M).

#### 5. Captação de glicose

A captação de glicose foi medida nas fatias frescas cerebelares. Brevemente, as fatias de 300  $\mu$ m foram transferidas para uma placa de 24 poços e incubadas por 15 minutos a 37°C em solução salina que continha (em mM): 137 NaCl, 5,36 KCl, 1,26 CaCl<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> e 5,6 de glicose, pH 7,4. O ensaio começou com a adição de 0,1  $\mu$ Ci/mL [2,3-<sup>3</sup>H]deoxi-D-glicose. A incubação foi parada após 15 minutos, removendo-se o meio e lavando-se a fatia com solução salina gelada. As fatias foram, então, homogeneizadas com hidróxido de sódio 0,5 M. A radioatividade foi medida num aparelho cintilador. A captação não específica foi determinada usando-se citocalasina B 25  $\mu$ M. A captação final de glicose foi obtida subtraindo-se a captação não específica do total captado medido no cintilador.

#### 6. Quantificação de ChAT

A enzima colina acetiltransferase foi quantificada através de *western blotting*. As proteínas da amostra homogeneizada em tampão contendo (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v)  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,002% de azul de bromofenol) e separadas por eletroforese em SDS-PAGE em 10% (w/v) de gel de acrilamida e eletrotransferidas para membradas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas em TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7,5, 137 mmol/L NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20) contendo 5% (w/v) albumina sérica bovina por uma hora a temperatura ambiente. Na

sequência, as membranas foram incubadas por uma hora com anticorpo anti-ChAT (1:5000) EMD Millipore, e  $\beta$ -actina (1:2000) Sigma Aldrich, embebidas com TBS-T, e expostas a anticorpos ligados à peroxidase por duas horas a temperatura ambiente. As bandas quimioluminescentes foram detectadas usando ImageQuant LAS4000 GE Healthcare, e as análises densitométricas foram feitas usando o *software* Image-J.

## 7. Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Os dados foram analisados por teste t de Student. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas para valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. O tratamento com STZ altera a quantidade de ChAT

A colina acetiltransferase é uma enzima chave na síntese de acetil-colina nos neurônios. Nas fêmeas (figura 2A) não houve alteração no seu conteúdo, enquanto que nos machos (figura 2B) encontramos uma diminuição significativa de sua quantidade no cerebelo, 8 semanas após a infusão de estreptozotocina.

### 2. O tratamento com STZ altera a captação de glicose

Para avaliação do metabolismo da glicose, nós realizamos um ensaio de captação de glicose tritiada nas fatias cerebelares frescas. Uma diferença significativa foi observada nas fêmeas (figura 3A) 4 semanas após a infusão de

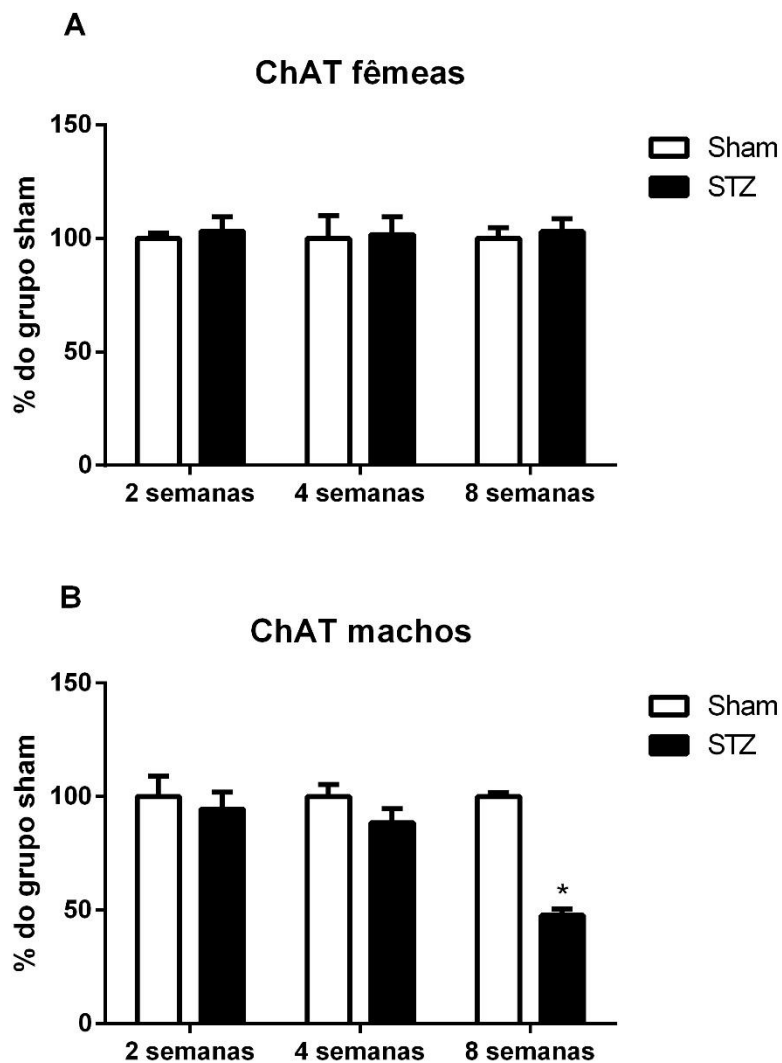
STZ. Nos machos (figura 3B), houve uma diferença significativa 8 semanas após a infusão da STZ.

### 3. O tratamento com STZ altera GFAP em fêmeas

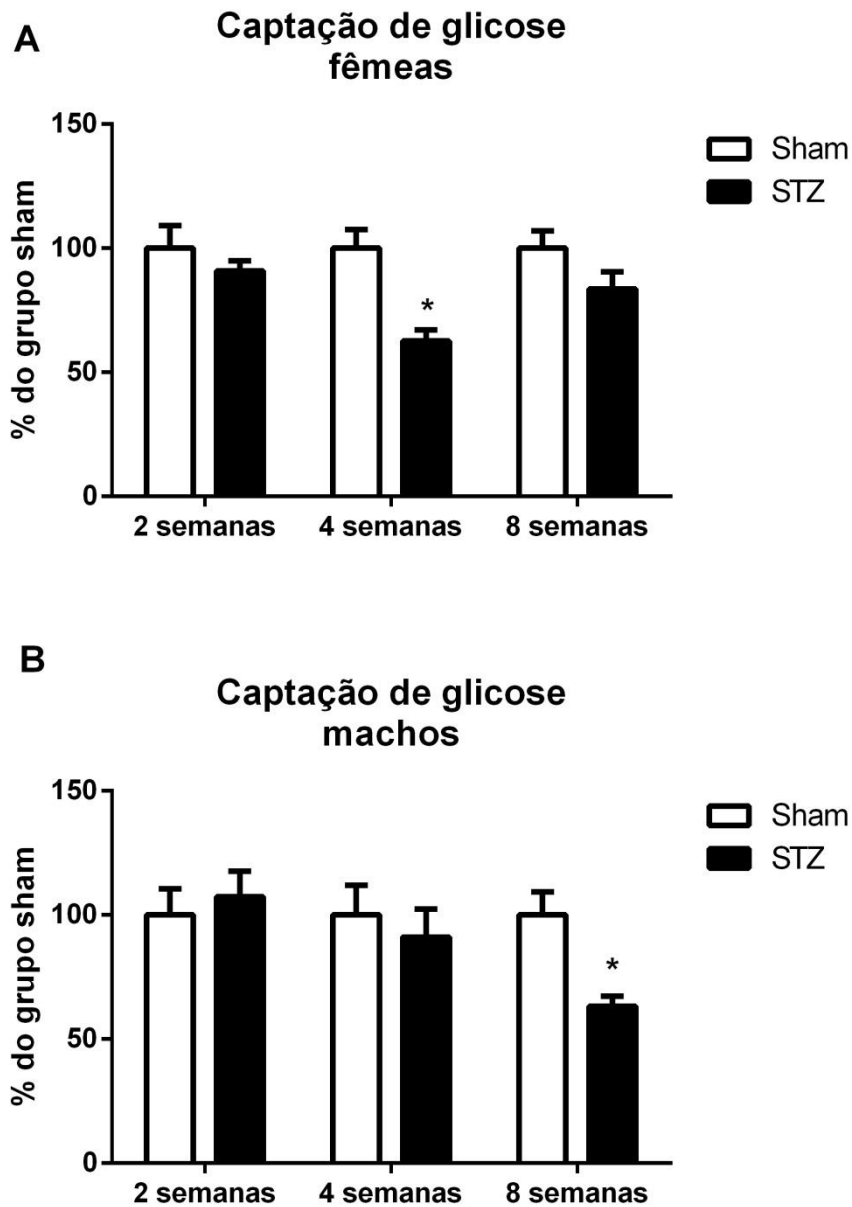
Com a intenção de avaliar a resposta astrocitária no cerebelo dos animais, quantificamos as proteínas GFAP e S100B. Diferentemente do que encontramos no hipocampo (BIASIBETTI et al., 2017), somente nas fêmeas expostas à STZ houve aumento na quantidade de GFAP (figura 4A). Os níveis de S100B não sofreram alterações no cerebelo dos animais expostos à STZ (figura 5).

### 4. O tratamento com STZ altera a GSH nas fêmeas

Com a intenção de avaliar o estresse oxidativo no tecido cerebelar dos animais, quantificamos o tripeptídeo glutathiona, principal antioxidante do SNC. Nos machos (figura 6B), houve uma diminuição significativa no grupo tratado com STZ, 4 e 8 semanas após a exposição. Nas fêmeas (figura 6A), nenhuma diferença foi observada.

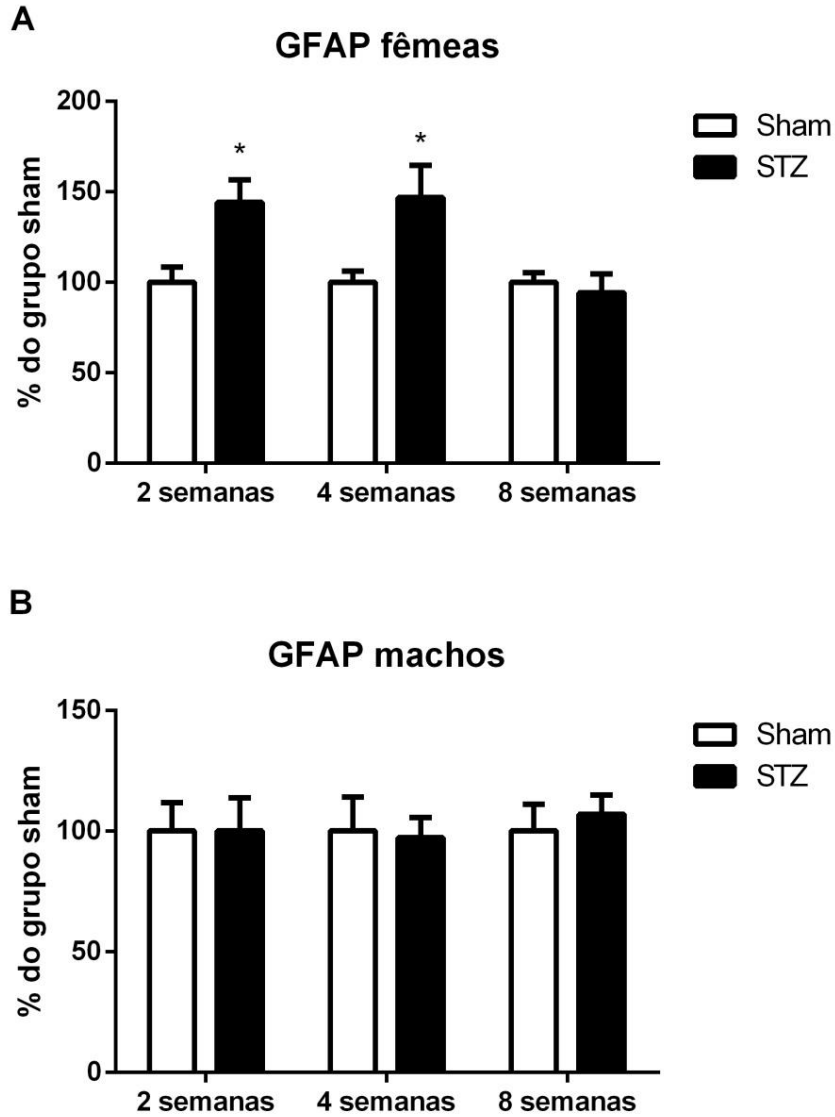


**Figura 2:** Conteúdo de ChAT no cerebelo de ratos(as) submetidos à infusão ICV de STZ. Ratas (A) e ratos (B) foram submetidos à infusão ICV de STZ. Duas, quatro ou oito semanas após, o cerebelo foi dissecado e os níveis de ChAT foram medidos por *western blotting* e as bandas de proteínas foram quantificadas por densitometria. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão. \*Diferença significativa entre o grupo STZ e seu respectivo grupo sham. (N=8, teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

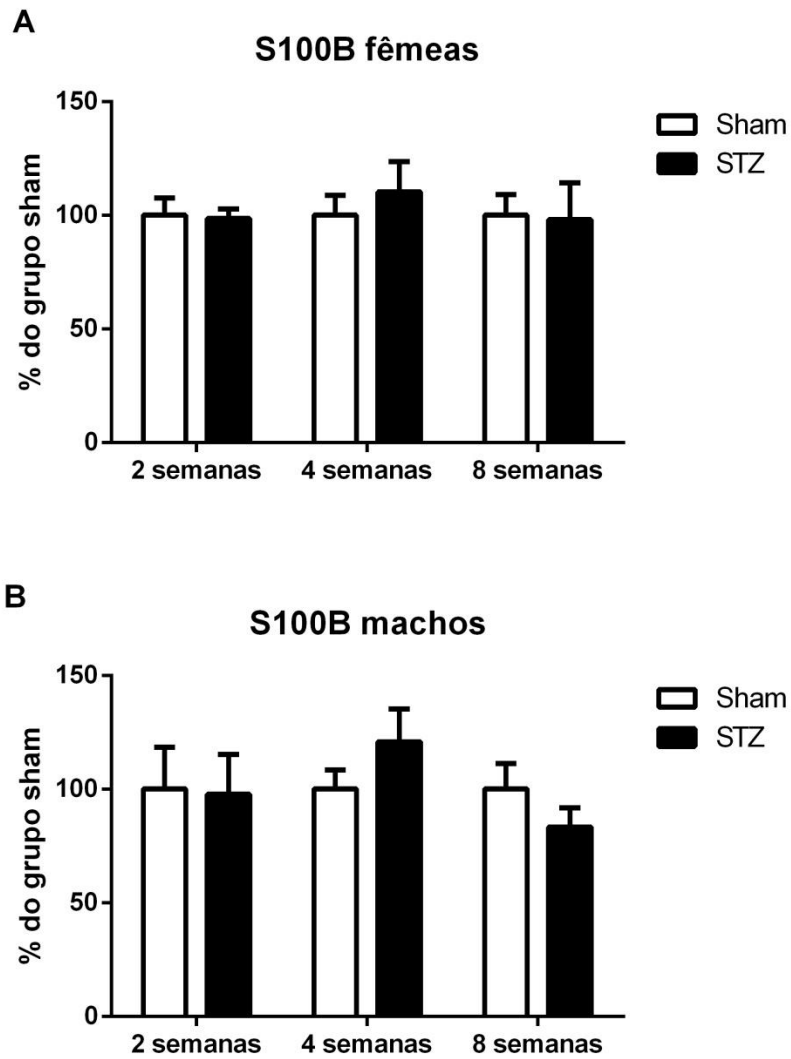


**Figura 3:** *Captação de glicose em fatias cerebelares de ratos (as) submetidos à infusão ICV de STZ.* Ratas (A) e ratos (B) foram submetidos à infusão ICV de STZ. Duas, quatro ou oito semanas após, o cerebelo foi dissecado e fatiado, e o ensaio de captação de glicose foi realizado. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão. \*Diferença significativa entre o grupo STZ e seu respectivo grupo sham. (N=8, teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

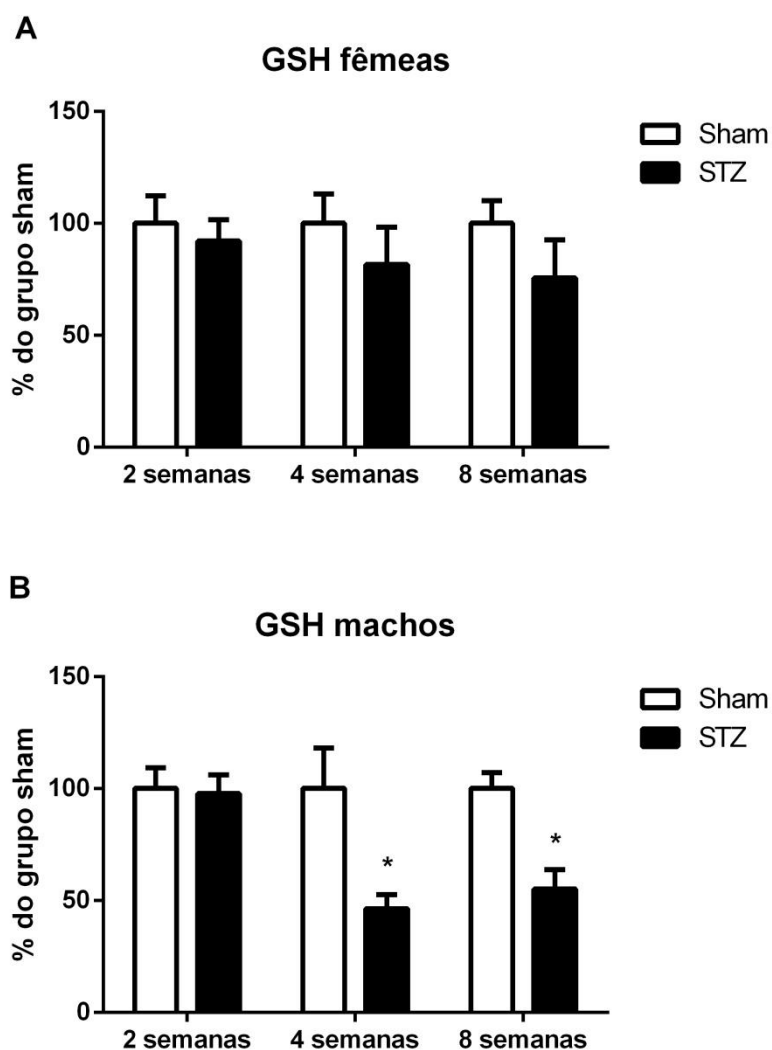




**Figura 4:** *Conteúdo de GFAP no cerebelo de ratos(as) submetidos à infusão ICV de STZ. Ratas (A) e ratos (B) foram submetidos à infusão ICV de STZ. Duas, quatro ou oito semanas após, o cerebelo foi dissecado e os níveis de GFAP foram medidos por ELISA. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão. \*Diferença significativa entre o grupo STZ e seu respectivo grupo sham. (N=7-8, teste t de Student,  $p < 0,05$ ).*



**Figura 5:** Conteúdo de S100B no cerebelo de ratos(as) submetidos à infusão ICV de STZ. Ratas (A) e ratos (B) foram submetidos à infusão ICV de STZ. Duas, quatro ou oito semanas após, o cerebelo foi dissecado e os níveis de S100B foram medidos por ELISA. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão, N=9.



**Figura 6:** Conteúdo de GSH no cerebelo de ratos (as) submetidos à infusão ICV de STZ. Ratas (A) e ratos (B) foram submetidos à infusão ICV de STZ. Duas, quatro ou oito semanas após, o cerebelo foi dissecado e os níveis de GSH foram medidos por ensaio fluorimétrico. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão. \*Diferença significativa entre o grupo STZ e seu respectivo grupo sham. (N=8, teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

## CAPÍTULO III

### Secreção de S100B em fatias hipocâmpais de ratos submetidos ao modelo de demência induzido por STZ: sinalização via BDNF

#### INTRODUÇÃO

Fatores neurotróficos podem ser entendidos como qualquer fator secretado capaz de estimular o crescimento, diferenciação ou sobrevivência de neurônios. O primeiro fator neurotrófico descoberto foi o NGF (do inglês *Nerve Growth Factor*) no início da década de 50. Anos mais tarde, foram identificadas mais três proteínas relacionadas a esta função, BDNF (do Inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 (*Neurotrophin 3*) e NT-4 (*Neurotrophin 4*), ficando, assim, estabelecida a família das neurotrofinas.

BDNF é amplamente distribuído no encéfalo, sendo detectável durante o desenvolvimento e aumentando no período pós-natal (KAISHO et al., 1991; KATOH-SEMBA et al., 1997). No sistema nervoso adulto, tanto a proteína quanto o mRNA são encontrados em níveis mais elevados no hipocampo, amígdala, córtex cerebral, hipotálamo e *septum*, e no sistema nervoso periférico, no gânglio da raiz dorsal. Sua expressão em neurônios é regulada por diversos fatores, incluindo insultos de hipóxia e hipoglicemia, estresse por imobilização, tratamento com antidepressivos, exercício físico, enriquecimento ambiental, etc. O estímulo ambiental que produz impulsos excitatórios nos neurônios e aumenta sua concentração de cálcio intracelular são os reguladores-chave no processo de transcrição do BDNF. Esta neurotrofina é um dos maiores reguladores da plasticidade no encéfalo (BRAMHAM; MESSAOUDI, 2005; LU, 2003; POO, 2001; SCHINDER; POO, 2000).

Cada neurotrofina liga a um ou mais receptores trk (do inglês *tropomyosin-related kinase*), membro da família dos receptores tirosina cinase (PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001). A ligação induz a dimerização do receptor e resulta na ativação da cinase nos domínios intracelulares e autofosforilação. Como resultado, várias são as cascatas que podem ser ativadas, como a da Ras-MAP e fosforilação de CREB (PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001; SEGAL, 2003). TrkA, encontrado em neurônios, liga NGF, TrkB liga BDNF e NT-4 e TrkC, encontrado em neurônios, liga NT-3 (BANFIELD et al., 2001; NAYLOR et al., 2002; WIESMANN et al., 1999). Há um receptor comum a todas as neurotrofinas: p75, localizado na membrana de neurônios e astrócitos (CHAO, 1994).

O receptor clássico de BDNF é o TrkB, que existe também na forma truncada, sendo localizado tanto em neurônios (TrkB) quanto em astrócitos (TrkB-t) (BERGAMI et al., 2008). Este receptor possui alta afinidade por BDNF e sua cascata de sinalização inclui as vias da (PI3K)/Akt, ERK e fosfolipase C $\gamma$ , sendo ativadas para a manutenção da sobrevivência neuronal e regulação da plasticidade sináptica (KUCZEWSKI; PORCHER; GAIARSA, 2010; NUMAKAWA et al., 2013). Evidências sugerem que a diminuição do BDNF e da sinalização por TrkB estão envolvidas na patogênese de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson, doença de Huntington e doença de Alzheimer, sendo um alvo terapêutico muito estudado para tratamento destas desordens (ALLEN et al., 2013).

Considerando que:

- Há alteração do conteúdo de S100B no hipocampo de ratos expostos ao modelo animal de DA esporádica oito semanas após a infusão de STZ (BIASIBETTI et al., 2013, 2017);
- Há relatos de alteração nos níveis de BDNF neste modelo (SIM, 2014);
- Este fator neurotrófico apresenta receptores em astrócitos (BERGAMI et al., 2008).

Resolvemos investigar sua ação sobre fatias hipocampais agudas (*ex vivo*) de ratos tratados com estreptozotocina via intracerebroventricular, bem como os prováveis mecanismos envolvidos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Animais**

Vinte e um ratos Wistar machos, de 3 a 4 meses de idade, pesando de 300 a 400 gramas foram obtidos da colônia de reprodução do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Eram mantidos em ambiente com luz e temperatura controladas (ciclo 12 horas claro/12 horas escuro, temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) tendo livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos de experimentação animal foram realizados conforme a legislação vigente e o projeto de número 23571 teve aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade.

Os animais foram divididos em dois grupos: sham e STZ. Após as tarefas comportamentais, eles foram eutanasiados, os hipocampus foram removidos e fatiados e algumas fatias foram destinadas ao experimento *ex vivo*. As demais

foram imediatamente congeladas em *freezer* -80°C para posterior quantificação do receptor p75.

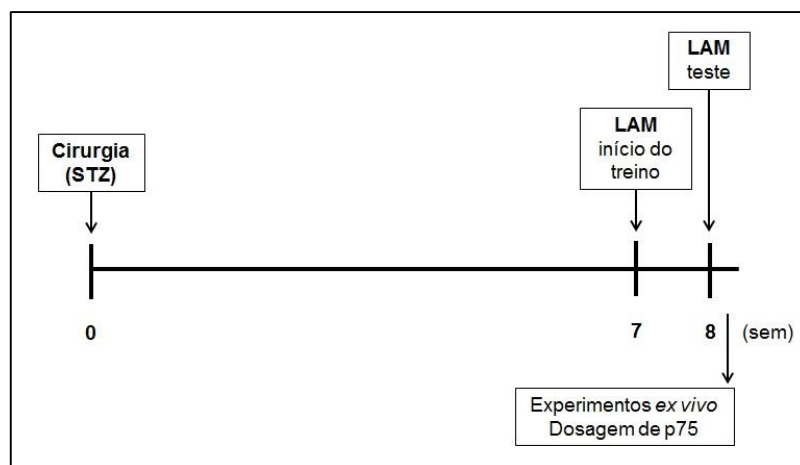
## 2. Procedimento cirúrgico

A STZ foi infundida nos ventrículos laterais, conforme trabalhos anteriores (BIASIBETTI et al., 2013). No dia da cirurgia, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (75 e 10 mg/kg, respectivamente, intraperitoneal) e posicionados em aparelho estereotáxico. Uma incisão medial foi feita no couro cabeludo. Os ventrículos laterais foram acessados de acordo com as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior ao bregma; 1,5 mm lateral à sutura sagital; 3,6 mm dorso-ventral. Para perfurar o crânio, fez-se uso de uma broca. Após posicionar a agulha conforme as coordenadas, 5 µL de STZ (3 mg/kg) ou veículo (Solução salina balanceada de Hank – HBSS – que contém em mM: 137 NaCl; 0,63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,17 NaHCO<sub>3</sub>; 5,36 KCl; 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,26 CaCl<sub>2</sub>; 0,41 MgSO<sub>4</sub>; 0,49 MgCl<sub>2</sub> e 10 de glicose, pH 7,4) foram infundidos em cada ventrículo usando uma seringa Hamilton. Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram colocados sobre uma placa de aquecimento (37,5 ± 0,5°C) e foram mantidos ali até se recuperarem da anestesia. Os animais foram submetidos à análise comportamental cognitiva e às análises bioquímicas oito semanas após a injeção de STZ ou veículo. O desenho experimental deu-se conforme a figura 7.

## 3. Labirinto Aquático de Morris

Nesta tarefa foi avaliada a memória espacial dos animais. Para tanto, os mesmos foram colocados em um tanque circular, medindo 183 cm de diâmetro e 58 cm de altura, preenchido de água (24 ± 1°C) até a altura de 25 cm. A sala de experimentação continha várias dicas espaciais espalhadas por suas

paredes, incluindo o próprio experimentador. Dentro do tanque havia uma plataforma de acrílico, 10 cm de diâmetro, submersa a 1,5 cm abaixo do nível d'água, que permaneceu em uma localização fixa durante as sessões de treino e foi retirada antes da sessão de teste. Os animais foram treinados durante cinco dias sendo que no sexto dia realizou-se o teste. Durante cada sessão de treino o animal foi colocado na água 4 vezes, a partir de 4 diferentes posições, escolhidas de forma aleatória. Cada uma destas largadas foi considerada uma tentativa do animal encontrar a plataforma em um tempo não maior do que 60 segundos e permanecer sobre a mesma por mais 20 segundos. Se isto não aconteceu neste período, o animal foi conduzido pelo experimentador até a plataforma. Foi aplicado o protocolo de Memória de Referência de acordo com (BIASIBETTI et al., 2013). A plataforma foi removida 24 h após a última sessão de treino e eles foram testados. No dia do teste, foram medidos(as) a latência de chegada à posição original da plataforma e o número de cruzamentos sobre o suposto local da mesma.



**Figura 7:** Desenho experimental esquemático. STZ: estreptozotocina; LAM: Labirinto Aquático de Morris; sem: semanas.



#### 4. Fatias hipocampais frescas

Após os animais serem anestesiados, seus hipocampos foram removidos e colocados em meio de salina gelado, que continha (em 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> e 10 glicose, pH 7,4 e fatiados de maneira transversal com auxílio de aparelho McIlwain Tissue Chopper. As fatias foram, então, transferidas imediatamente para uma placa de cultura de 24 poços, onde continha 300 µL de meio fisiológico, ficando uma fatia em cada poço. O meio salino era trocado a cada 15 minutos a temperatura ambiente. A estabilização das fatias durou 120 minutos, conforme protocolo de (NARDIN et al., 2009). Após este período, foi realizado o tratamento das mesmas conforme a descrição abaixo, por uma hora a 30°C, com exceção do tratamento realizado com ANA-12 + BDNF, onde o antagonista TrkB foi incubado 15 minutos antes de se adicionar BDNF ao meio.

- a) Salina (basal)
- b) Alto potássio (30 mM)
- c) BDNF (20 ng/mL)
- d) Alto potássio (30 mM) + BDNF (20 ng/mL)
- e) Dimetilsulfóxido (DMSO) (0,8%)
- f) ANA-12 (100 µM) (antagonista de receptor TrkB)
- g) ANA-12 (100 µM) + BDNF (20 ng/mL)

Após uma hora de incubação, o meio foi coletado para posterior dosagem da concentração de proteína S100B. A quantidade encontrada é tida como o que foi secretado pela fatia hipocampal após o tratamento.

#### 5. Quantificação de S100B

O imunoconteúdo de S100B secretado foi medido por ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) de acordo com (LEITE et al., 2008). Brevemente, o meio coletado foi diluído e 50 µL de amostra mais 50 µL de tampão Tris foram incubados por duas horas em uma placa de microtitulação previamente revestida de anticorpo monoclonal anti-S100B. O anticorpo policlonal anti-S100B foi posteriormente incubado por 30 minutos e então o anticorpo *anti-rabbit* conjugado à peroxidase foi adicionado por mais 30 minutos. Uma reação colorimétrica com o-fenilenodiamina foi medida em 492 nm. A curva-padrão de S100B variou de 0,0020 a 1 ng/mL.

## 6. Outros ensaios

O conteúdo extracelular de S100B foi considerado como “secretado” baseado na medida de viabilidade celular (dados não mostrados aqui), através da medida da atividade da lactato desidrogenase (LDH) e o método de redução do MTT (BERRIDGE; TAN, 1993).

## 7. Quantificação de p75

A quantidade de receptor de neurotrofinas p75 foi medida através de *western blotting*. As proteínas da amostra homogeneizada em tampão contendo (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) β-mercaptoetanol e 0,002% de azul de bromofenol) foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE em 10% (w/v) de gel de acrilamida e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas em TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7,5, 137 mmol/L NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20) contendo 5% (w/v) albumina sérica bovina por uma hora a temperatura ambiente. Na sequência, as membranas foram incubadas por uma

hora com anticorpo anti-p75 (1:1000) EMD Millipore, e  $\beta$ -actina (1:2000) Sigma Aldrich, embebidas com TBS-T, e expostas a anticorpos ligados à peroxidase por duas horas a temperatura ambiente. As bandas quimioluminescentes foram detectadas usando ImageQuant LAS4000 GE Healthcare, e as análises densitométricas foram feitas usando o *software* Image-J.

## 8. Análise estatística

Os dados dos experimentos *ex vivo* serão apresentados como média  $\pm$  erro padrão e foram analisados estatisticamente por ANOVA de duas vias, pós-teste de Fisher com diferença mínima significativa, enquanto que os dados da avaliação cognitiva foram analisados por teste t de Student. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas para valores de  $p < 0,05$

## RESULTADOS

### 1. O tratamento com STZ causa declínio cognitivo

Oito semanas após a infusão da STZ foi realizado o teste de aprendizado e memória no labirinto aquático de Morris, após o quarto dia de treino, já houve alterações significativas no tempo de chegada à plataforma dos animais do grupo STZ em comparação ao grupo sham (figura 8A). Esta diferença no aprendizado e memória dos animais foi verificada no teste, através da medida da latência de chegada e do número de cruzamentos (figuras 8B e 8C).

### 2. O tratamento *ex vivo* com alto potássio altera a secreção de S100B

Oito semanas após a infusão de STZ, os animais foram eutanasiados, seus hipocampus foram removidos e fatiados e as fatias hipocampais frescas

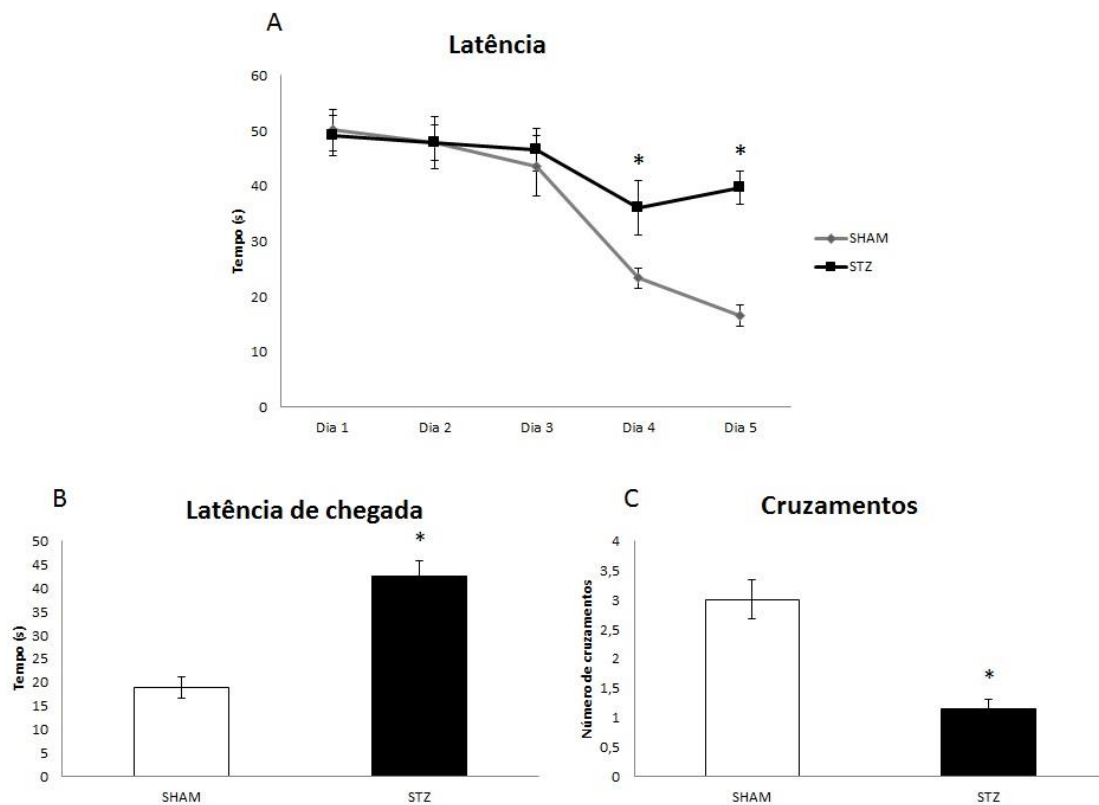
foram incubadas em meio com BDNF, com alta concentração do íon potássio (30 mM) ou ambos no mesmo poço. Como se pode observar na figura 9, houve uma diminuição da secreção de S100B pelas fatias dos animais sham que foram tratadas com meio com alta concentração de potássio.

### 3. O tratamento com STZ causa redução do receptor p75

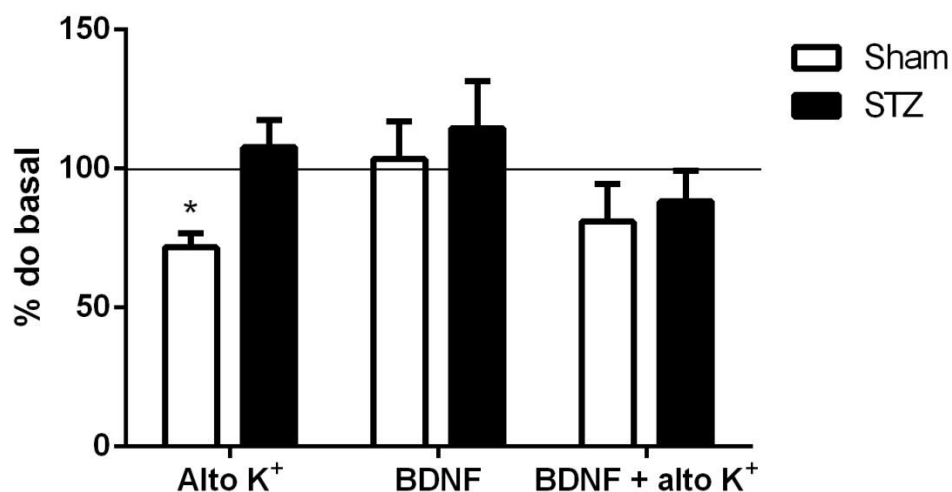
Com a intenção de avaliar os receptores de neurotrofinas, quantificamos o receptor p75 e encontramos uma redução de sua quantidade no hipocampo dos ratos que receberam a STZ (figura 10).

### 4. O tratamento *ex vivo* com antagonista trkB altera a secreção de S100B

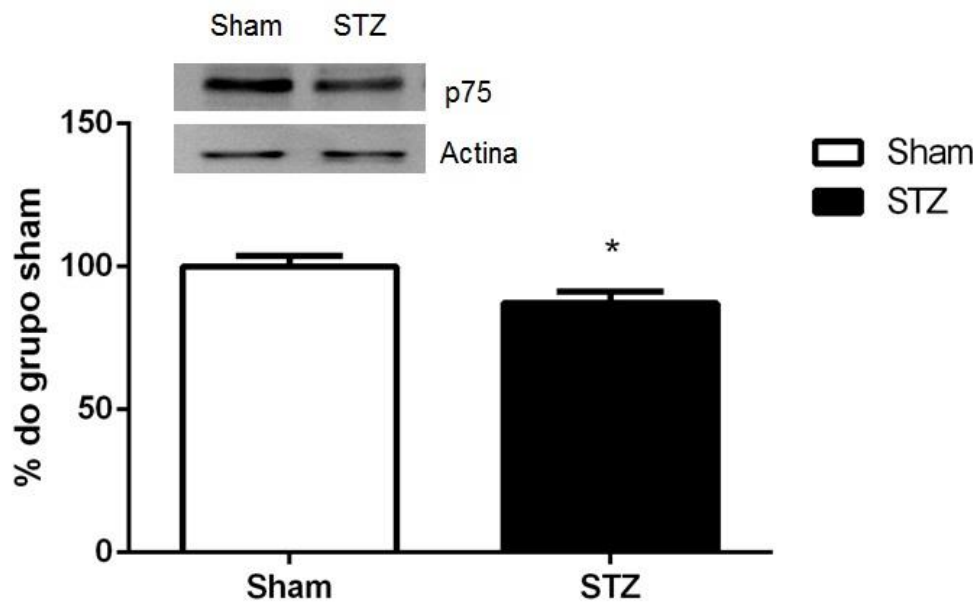
Com a intenção de avaliar a via de ação do BDNF, realizamos um tratamento com ANA-12, um antagonista seletivo trkB, em concomitância com BDNF. Encontramos uma diminuição na secreção de S100B nas fatias hipocampais provindas dos animais infundidos com STZ (figura 11), diferentemente do grupo sham, que não demonstrou alteração neste parâmetro.



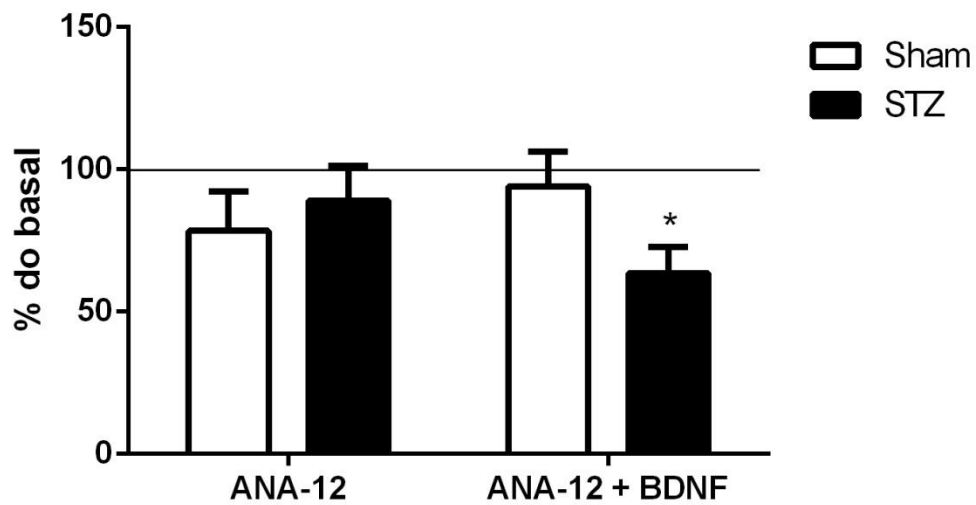
**Figura 8:** Desempenho cognitivo dos animais avaliado no teste do Labirinto Aquático de Morris. (A) Desempenho no protocolo de memória de referência, baseada na latência de escape. \*Diferença significativa do grupo STZ em relação ao grupo sham (N=10-11, teste t de Student,  $p < 0,05$ ). (B) Memória no teste, quando se remove a plataforma do labirinto aquático e se mede a latência de chegada até este local. \*Diferença significativa do grupo STZ em relação ao grupo sham (N=10-11, teste t de Student,  $p < 0,05$ ). (C) Número de cruzamentos médio que o grupo de animais fez sobre o lugar onde originalmente a plataforma era posicionada. \*Diferença significativa do grupo STZ em relação ao grupo sham (N=10-11, teste t de Student,  $p < 0,05$ ).



**Figura 9:** *Secreção de S100B avaliada após o tratamento ex vivo das fatias hipocâmpais. A linha traçada em 100% representa a secreção média obtida das fatias tratadas com salina para cada grupo (sham e STZ). Cada barra representa a média ± erro padrão em relação ao basal no seu respectivo grupo. \*Diferença significativa do grupo sham alto K<sup>+</sup> em relação ao grupo sham basal (representado na linha 100%) (N=8, ANOVA de duas vias seguida de teste de Fisher, p<0,05).*



**Figura 10:** Quantificação do receptor p75 no hipocampo de ratos infundidos (ou não) com STZ via ICV. \*Diferença significativa do grupo sham em relação ao grupo STZ (N=8, teste t de Student,  $p < 0,05$ ).



**Figura 11:** Secreção de *S100B* avaliada após o tratamento *ex vivo* das fatias hipocâmpais. A linha traçada em 100% representa a secreção média obtida das fatias tratadas com DMSO 0,8% (veículo utilizado para solubilizar o antagonista ANA-12) para cada grupo (sham e STZ). Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão em relação ao basal-DMSO no seu respectivo grupo. \*Diferença significativa do grupo STZ tratado com ANA-12+BDNF em relação ao grupo STZ tratado com DMSO (representado pela linha 100%) (N=7-8, ANOVA de duas vias seguida de teste de Fisher,  $p < 0,05$ ).



## DISCUSSÃO

**Tabela 1.** Resumo das alterações neuroquímicas hipocampais e cerebelares, de machos e fêmeas, no modelo de demência induzido por STZ.

	sexo	Machos						Fêmeas					
	tecido	HC			CB			HC			CB		
	tempo	2 sem	4 sem	8 sem	2 sem	4 sem	8 sem	2 sem	4 sem	8 sem	2 sem	4 sem	8 sem
Parâmetro	ChAT	↓	↓	↓	-	-	↓	-	-	↓	-	-	-
	Captação de glicose	-	↓	↓	-	-	↓	↓	-	-	-	↓	-
	GFAP	↑	↑	↑	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	-
	S100B	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GSH	-	↓	↓	-	↓	↓	-	↓	-	-	-	-

### 1. Alterações hipocampais e cerebelares no modelo de demência induzido por infusão ICV de STZ

No presente estudo, foi possível observar que as alterações cognitivas e os parâmetros neuroquímicos medidos no hipocampo e no cerebelo de animais infundidos com estreptozotocina foram dependentes do sexo e do tempo. Por isso, estes resultados podem ajudar a entender melhor o modelo de demência e dar pistas sobre alguns aspectos que a clínica apresenta de diferente em ambos os gêneros na doença de Alzheimer. Vide o resumo na Tabela 1.

Quando analisamos o quadro da doença de Alzheimer, vemos que os dados neuropatológicos mais relevantes em pacientes são presença de placas senis extracelulares compostas de agregados filamentosos do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), emaranhados neurofibrilares intracelulares (formadas pela proteína tau fosforilada), atrofia cortical difusa, degeneração neurovascular e

perdas neuronais e sinápticas envolvendo vários sistemas de neurotransmissão (SERRANO-POZO et al., 2011). Apesar de ser possível a presença destas alterações no cérebro de idosos saudáveis, os sintomas não são observados conjuntamente e nem com a mesma intensidade do que em pacientes acometidos pela DA. As placas e emaranhados citados anteriormente estão localizados(as), sobretudo, nas amígdalas cerebelares, no hipocampo e no córtex entorrinal do lóbulo temporal, enquanto as porções parietais e frontais do córtex associativo são menos afetadas (SERRANO-POZO et al., 2011). O cerebelo não é uma estrutura “clássica” destacada entre as regiões atingidas primariamente na DA. Entretanto, um grupo de pesquisadores descobriu uma correlação positiva entre o estágio da doença e o volume cerebelar, onde quanto maior o declínio cognitivo apresentado pelo paciente, menor o volume cerebelar (BALDAÇARA et al., 2011). Nossos dados confirmam o menor, mas existente, comprometimento do cerebelo comparado ao hipocampo no modelo de demência com STZ.

Outra particularidade da DA, além das citadas anteriormente, é o fato de que mais mulheres do que homens desenvolvem a doença. A Tabela 2 apresenta um levantamento dos casos encontrados na comunidade europeia onde se vê claramente a diferença da prevalência da DA entre ambos os gêneros.

**Tabela 2.** Incidência da doença de Alzheimer em diferentes grupos de idade e gêneros. Os números são a porcentagem da população na comunidade europeia que tem a doença. Adaptado de (VIÑA; LLORET, 2010).

Idade dos grupos	Homens	Mulheres
60-64	0,2	0,9
65-69	1,8	1,4
70-74	3,2	3,8
75-79	7,0	7,6
80-84	14,5	16,4
85-89	20,9	28,5
90-95	29,2	44,4
>95	32,4	48,8

Alguns autores levantam possíveis explicações sobre este fato: a longevidade das mulheres é mais alta e elas são maioria entre as pessoas idosas; elas apresentam mais fatores de risco para a DA, como obesidade e diabetes; homens com DA morrem mais rapidamente que as mulheres nas mesmas condições; alguns estudos trazem o nível de educação como um fator que contribui para o desenvolvimento da doença, onde se tem que quanto maior o nível educacional, menos chances de se desenvolver a doença, e isto está relacionado à prevalência da DA em mulheres, que em muitos países não têm o mesmo acesso ao estudo que os homens; os níveis de testosterona são maior em homens e os de estrogênio são menores em mulheres pós-menopausa, e isto está diretamente relacionado à função cognitiva (BAUM, 2005; LAWS; IRVINE; GALE, 2016; VIÑA; LLORET, 2010).

Do ponto de vista clínico, é muito importante ter em mente que muitas doenças apresentam diferentes prevalências em homens e mulheres, e estas

disparidades não podem ser somente explicadas pelas diferenças no estilo de vida das pessoas. Muitas doenças psiquiátricas apresentam este viés de gênero. Por exemplo, depressão maior, ansiedade e transtornos alimentares são mais prevalentes em mulheres e esquizofrenia, autismo e déficit de atenção são diagnosticados com maior frequência em homens (DAVIES; WILKINSON, 2006).

O que vimos neste trabalho, analisando o comportamento e alguns parâmetros neuroquímicos, foi uma diferença na resposta à infusão de STZ por parte de ratos e ratas e, nos próximos parágrafos, vamos tentar dissertar sobre os possíveis fatores e achados em estudos anteriores que justifiquem o que encontramos.

Para avaliar os efeitos da estreptozotocina na cognição dos animais, fizemos uso de um teste comportamental amplamente utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido (CLARK; ZOLA; SQUIRE, 2000). Encontramos um prejuízo cognitivo significativo nos machos, já duas semanas após a infusão da STZ. Nas fêmeas, o prejuízo somente foi verificado quatro semanas após o tratamento, evidenciando sua maior resistência à STZ.

A maior parte dos estudos realizados com o modelo de DA por STZ em roedores têm como alvo o hipocampo, por se tratar de uma estrutura-chave para a memória e cuja integridade e função é muito afetada na DA. A atividade da enzima catalase, conhecida por catalisar a decomposição de peróxido de hidrogênio em água + oxigênio, evitando, desta forma, um dano celular por parte do peróxido e os radicais hidroxila, foi medida em hipocampo, tronco encefálico e cerebelo, após a infusão de STZ (SOFIC et al., 2015; TAHIROVIC et al., 2007).

Os autores encontraram uma diminuição da enzima e do radical hidroxila no grupo STZ nos três tecidos em questão, já demonstrando que a STZ tem influência sobre as defesas antioxidantes das células cerebelares.

Ao longo dos anos, têm-se visto uma crescente atenção às diferenças fisiológicas e morfológicas entre machos e fêmeas, na busca por explicações das mudanças comportamentais. A questão hormonal está muito presente nas discussões referentes a este tema, e muitas já são as descobertas sobre. Na medida em que receptores para andrógenos, gestágenos e estrógenos foram sendo elucidados, bem como sua localização e cascata de sinalização, mais se pode inferir a respeito de seus efeitos sobre as células (MCDEVITT et al., 2008; MERMELSTEIN, 2009; MERMELSTEIN; MICEVYCH, 2008; MICEVYCH; DOMINGUEZ, 2009; RAZ et al., 2008). Estudos pioneiros sugerem que os estrógenos podem mediar a resistência à ação da STZ nas fêmeas (LANNERT et al., 1998; WEINSTOCK; SHOHAM, 2004), entretanto, sabe-se que andrógenos também exercem efeitos neuroprotetores no modelo em questão sobre os machos (NAYEBI; POURRABI; HOSSINI, 2014; SEYEDREZA; ALIREZA; SEYEDEBRAHIM, 2012). Sabe-se que a aromatase, enzima responsável pela síntese de estradiol a partir de testosterona, tem muitas ações no encéfalo, como regulação da atividade e plasticidade sináptica, neurogênese e resposta do tecido neural à injúria, humor e cognição (LERANTH et al., 2004; LERANTH; HAJSZAN; MACLUSKY, 2004) e seus níveis estão alterados na DA.

Esteroides são essenciais para o funcionamento do encéfalo, tendo ações tanto sobre neurônios quanto sobre astrócitos. A tabela 3 é adaptada de (ACAZ-FONSECA et al., 2016) e resume as principais diferenças entre os sexos nas células astrogliais.

**Tabela 3.** Exemplos de diferenças sexuais encontradas sob condições patológicas e fisiológicas em células astrogliais.

	<b>Fisiologia</b>	<b>Patologia</b>
Encéfalo em desenvolvimento	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Morfologia astrocítica é mais complexa em machos que em fêmeas no núcleo arqueado e área pré-óptica.</li> <li>2. Cultura de astrócitos diencefálicos de fêmeas apresentam um maior número de células GFAP positivas que as derivadas de machos.</li> <li>3. Maior capacidade de captação de glutamato pelas células de fêmeas.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Modelos de estresse pré-natal induzem astrogliose na vida adulta, sendo que esta resposta é mais exacerbada em machos que em fêmeas.</li> <li>2. Resposta mais robusta de astrócitos de machos frente aos seguintes insultos: glutamato, LPS, dimetoato, canabinoides, MPP+ e privação de oxigênio e glicose.</li> </ol>
Encéfalo adulto	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Maior número de astrócitos em machos que em fêmeas no hipocampo, amígdala medial e núcleo supraquiasmático.</li> <li>2. Maior superfície de corpos celulares de células GFAP-positivas e prolongamentos em machos do que em fêmeas no hipocampo, núcleo arqueado do hipotálamo, globo pálido, núcleo supraóptico e núcleo interpeduncular.</li> <li>3. Maior intensidade de coloração de GFAP em fêmeas do que em machos na amígdala medial e no cerebelo.</li> <li>4. Morfologia mais complexa dos astrócitos nos machos que nas fêmeas na amígdala medial e no núcleo arqueado do hipotálamo.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Maior expressão de GFAP em fêmeas que em machos (isquemia)</li> <li>2. Maior expressão de S100B em fêmeas que em machos (pacientes esquizofrênicos).</li> </ol>

Os neurônios hipocampais sintetizam estradiol e este mantém a potenciação de longa duração (LTP) e as sinapses em fêmeas, mas não em machos. Em fêmeas, a inibição de sua síntese resulta no prejuízo do LTP, desfosforilação da cofilina e perda sináptica. Estes efeitos não são observados

nos machos. O papel essencial do estrogênio na estabilidade e manutenção da conectividade no hipocampo pode ser correlacionado ao declínio cognitivo que vem com o envelhecimento nas mulheres. São duas as principais vias de sinalização do estrogênio na manutenção das sinapses: via fosforilação de LIMK e consequente formação de filopodia e via fosforilação de AKT que acaba por estimular a translocação de PSD-95 (HARA et al., 2015). Além da ação sobre neurônios, os hormônios esteroides sexuais exercem efeito sobre microglia, oligodendrócitos, células endoteliais e astrócitos. Como no hipocampo, o estradiol tem importante papel no desenvolvimento do cerebelo, mas não necessariamente difere entre os sexos. O processo de esteroidogênese existe nas células de Purkinje e os hormônios ali produzidos parecem afetar diretamente a neurotransmissão cerebelar glutamatérgica (SMITH, 1989).

No início dos anos 90, o papel do gênero e dos hormônios gonadais no risco de desenvolvimento da DA estavam começando a serem investigados. Os primeiros relatos sugeriram que as terapias com estrógenos tipicamente administrados em terapias de reposição hormonal em pacientes com sintomas de menopausa, poderia reduzir os riscos de DA e atenuar os déficits cognitivos associados à doença (FILLIT et al., 1986; HENDERSON et al., 1994). Um mecanismo pelo qual o estrogênio tem suas ações mnemônicas benéficas em pacientes com DA pode ser devido à sua capacidade de impactar o sistema colinérgico, (LUINE, 1985; LUINE; KHYLCHEVSKAYA; MCEWEN, 1975), um sistema classicamente relacionado ao desempenho em aprendizado e memória (FLICKER et al., 1983). O sistema colinérgico está associado ao gênero e idade (LUINE et al., 1986), é o mais afetado inicialmente na doença de Alzheimer, tanto

que os medicamentos mais utilizados para controle dos sintomas são os anticolinesterásicos, como galantamina, rivastigmina e donepezil (ELLIS, 2005).

Nossos achados no modelo animal de DA por STZ confirmam o déficit colinérgico relatado em estudos anteriores (EJAZ AHMED et al., 2013; ISHRAT et al., 2009), sendo que a diminuição da quantidade de enzima é observada desde duas semanas após a infusão no hipocampo dos machos e o dano é permanente. Enquanto que no cerebelo esta diminuição só pode ser vista oito semanas pós-infusão, nos mostrando que tanto as fêmeas quanto o tecido cerebelar são mais resistentes à ação da STZ. No hipocampo, sabemos da influência do estradiol sobre o sistema colinérgico (BOHACEK; BEARL; DANIEL, 2008; GIBBS, 2000; PING et al., 2008) e, portanto, seu impacto na cognição (DANIEL; DOHANICH, 2001; RUDICK; GIBBS; WOOLLEY, 2003).

No cerebelo, observamos uma diminuição da quantidade de colina acetiltransferase somente oito semanas após a infusão de STZ e exclusivamente em machos. Esta estrutura possui um sistema colinérgico, embora os níveis globais de acetilcolina e colina acetiltransferase sejam menores comparados a outras regiões encefálicas (OJIMA; KAWAJIRI; YAMASAKI, 1989).

Sabe-se que o transporte da glicose pelas células e a glicólise são alvos de modulação do estradiol (RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014) e o metabolismo deste carboidrato é muito afetado na DA (HOYER, 2004). Um estudo com 18F-fluorodeoxiglicose (18F-FDG PET) em adultos saudáveis demonstrou que o metabolismo da glicose em mulheres é maior que nos homens (YOSHIZAWA et al., 2014). Nos animais, encontramos um perfil similar em fatias hipocâmpais frescas, usando [<sup>3</sup>H]deoxi-D-glicose, onde parece haver uma captação menor nos ratos STZ quatro semanas após sua infusão e este dano



permanece, enquanto nas fêmeas, o dano ao transporte e captação de glicose é passageiro, sendo visto somente duas semanas após a infusão de STZ. As fêmeas foram mais sensíveis ao dano, mas temporariamente afetadas.

No cerebelo, houve alterações na captação de glicose, e o mesmo perfil foi observado: as fêmeas apresentaram um dano passageiro em quatro semanas e os machos um dano em oito semanas. O cerebelo é afetado tardiamente na DA, quando se fala de taxa de utilização de glicose. Somente os pacientes em estágio avançado da doença apresentaram diferença dos pacientes saudáveis (ISHII et al., 1997), enquanto que em outras regiões, como lobo frontal e parietal, os pacientes com DA moderada já apresentaram diferença dos saudáveis.

Alterações gliais específicas frequentemente precedem os sinais histopatológicos da DA (FULLER; MÜNCH; STEELE, 2009; ORRE et al., 2014; VERKHRATSKY et al., 2010) e estas alterações são mantidas com a progressão da doença (RODRÍGUEZ-ARELLANO et al., 2015). A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é um marcador conhecido da reatividade dos astrócitos. Outros trabalhos utilizando STZ via ICV como modelo de DA esporádica mostraram seu aumento no hipocampo (PRICKAERTS; FAHRIG; BLOKLAND, 1999; RAI et al., 2014). Nós reproduzimos este efeito, tanto em machos quanto em fêmeas, sendo visto em duas semanas após a infusão e mantendo-se após quatro e oito semanas, tanto em machos quanto em fêmeas, não sendo observada, portanto, expressão dependente de sexo.

Outra proteína astrocitária estudada neste trabalho é a S100B. Esta proteína é secretada por astrócitos e tem sido proposta como moduladora da neuroinflamação em doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (DONATO et al., 2009; WILCOCK; GRIFFIN, 2013). Os astrócitos estão presentes ao redor

das placas amiloides, apresentando uma quantidade de S100B aumentada (MRAK; SHENG; GRIFFIN, 1996). No modelo animal de demência que apresentamos nesta tese, já encontramos diminuição de S100B no líquido cefalorraquidiano (BIASIBETTI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2009; TRAMONTINA et al., 2011), e esta diminuição é visto, também, quando outros modelos de demência são reproduzidos, como por exemplo a injeção ICV de ácido ocadaico (BROETTO et al., 2016) e hipoperfusão cerebral crônica (VICENTE et al., 2009). No nosso trabalho, observamos um aumento tardio de sua quantidade, e somente no hipocampo dos machos, indicando não haver uma relação direta entre a injúria por STZ e a presença de estradiol.

Quando analisamos o cerebelo das fêmeas infundidas com STZ, os astrócitos parecem estar reativos, comparando-se aos machos, uma vez que a quantidade de GFAP aumentou duas e quatro semanas após a exposição. Um trabalho muito interessante fez uma comparação histológica e imunistoquímica com cerebelos provindos de pacientes saudáveis, idosos e com DA, encontrando significativas diferenças na quantidade de GFAP dentre os subtipos de astrócitos encontrados nos indivíduos doentes. Diferentes neurônios desempenham diferentes funções, mesmo dentro de uma mesma estrutura e o mesmo ocorre com os astrócitos, sendo que a GFAP foi encontrada alterada somente em alguns subtipos de astrócitos, dentre os nove identificados (ALVAREZ et al., 2015), contudo, este estudo não realizou uma comparação entre homens e mulheres.

Um sinal da disfunção astrocitária é a diminuição da glutatona reduzida (STEELE; ROBINSON, 2012). No modelo de DA por STZ encontramos uma diminuição passageira de seu conteúdo nas fêmeas e uma diminuição

permanente nos machos, como já descrito anteriormente (BIASIBETTI et al., 2013). Há três enzimas envolvidas em seu metabolismo que são sensíveis a hormônios sexuais esteroides (PAJOVIĆ; SAICIĆ, 2008): glutathione-S-transferase (envolvida na síntese de glutathione), glutathione peroxidase (envolvida na defesa contra o superóxido) e glutathione reductase (envolvida na reciclagem de glutathione) e este parece ser o motivo pelo qual observamos diferenças entre machos e fêmeas.

No cerebelo dos animais expostos à STZ, encontramos os mesmos resultados que o hipocampo dos machos apresentou: diminuição da GSH quatro e oito semanas após a exposição. Ruszkiewicz e colaboradores (2016) recentemente testaram a resposta do cerebelo frente ao insulto com metilmercúrio, onde parâmetros como tioredoxina reductase, tioredoxina e glutathione nas fêmeas não sofreram alteração em seu conteúdo, enquanto que nos machos houve mudanças significativas, demonstrando, por fim, que o cerebelo apresenta uma resposta sexo-específica no que diz respeito ao estresse oxidativo (RUSZKIEWICZ et al., 2016).

Nosso trabalho, utilizando a infusão de estreptozotocina via intracerebroventricular como modelo animal de DA esporádica, aponta para uma resistência maior das fêmeas às alterações induzidas. Esta maior resistência das ratas enfatiza a importância da dependência do sexo do animal em resposta à injúria encefálica e contrasta com o que é observado na clínica, onde mulheres são mais afetadas pela DA que homens. Contudo, é importante ressaltar algumas limitações que tivemos no desenvolvimento do trabalho:

1. As alterações que pudemos visualizar são de uma fase pré-amiloide, e a maioria dos estudos em seres humanos são conduzidos quando a doença já está estabelecida e diagnosticada (LAWS; IRVINE; GALE, 2016).
2. Nós analisamos alterações neuroquímicas em ratos e ratas adultos(as), em idade fértil e que, conseqüentemente exibem características de dimorfismo sexual diferentes daquelas observadas em indivíduos mais velhos (BALE; EPPERSON, 2015).
3. Fizemos uso de somente uma tarefa de avaliação cognitiva, que avalia um tipo de memória. Há outras que poderiam reforçar e/ou ajudar a entender melhor este modelo animal (GULINELLO et al., 2009; STOVER et al., 2015).
4. O cerebelo não é alvo comum de estudo neste modelo animal, apesar de que se sabe que ele está ativado na execução de tarefas cognitivas, incluindo linguagem, memória de trabalho e processamento espacial (ALVAREZ et al., 2015; SCHMAHMANN, 2016)(Ito, 2008) e, também de suas alterações na DA (ALVAREZ et al., 2015; SCHMAHMANN, 2016).

## **2. Secreção de S100B mediada por BDNF em fatias hipocampais**

O modelo de fatias hipocampais frescas para avaliação da atividade astrogliar é muito utilizado em nosso grupo, devido à preservação da circuitaria neural e da rede de astrócitos (NAGY; LI, 2000; NARDIN et al., 2009). Além disso, é um procedimento de fácil execução, sendo que a avaliação da secreção de S100B nesse modelo *ex vivo* parece ser muito útil, pois preserva algumas características observadas em culturas de astrócitos (PINTO et al., 2000; SHASHOUA; HESSE; MOORE, 1984; WARTCHOW et al., 2016). Além disso,

podem ser quantificados outros parâmetros de avaliação de atividade astrogliar, tais como: GSH, captação de glutamato, captação de glicose e atividade da glutamina sintetase.

Nossos resultados mostram que a secreção basal de S100B hipocampal *ex vivo* não se altera no modelo de demência induzido por STZ (dados não mostrados; Rodrigues et al, 2010). No entanto, na presença de alto potássio, que leva a uma redução da secreção de S100B em fatias hipocampais, possivelmente em função de um aumento fluxo intracelular de  $Ca^{2+}$  (NARDIN et al., 2009), não alterou a secreção de S100B em animais tratados com STZ. Isso sugere uma mudança do mecanismo mediado pelo  $Ca^{2+}$  nesses astrócitos ou que a morte neuronal afeta a comunicação neurônio-gliar. O BDNF não alterou a secreção basal de S100B nas fatias hipocampais de animais sham, mas foi capaz de antagonizar a redução de S100B na presença de alto potássio. Nada disso é observado nas fatias de animais STZ. O significado e mecanismo destes resultados ainda são incertos.

O conteúdo de p75, um dos receptores de BDNF e outras neurotrofinas, é menor no hipocampo de animais STZ. Isso certamente contribui para mudanças neuroquímicas e cognitivas hipocampais nestes animais, mas ainda é indefinido se esta alteração está relacionada à falta de resposta de secreção da S100B. Por outro lado, o antagonista de BDNF (via receptor TrkB) reduziu a secreção de S100B na presença de BDNF somente nas fatias de animais tratados com STZ. Ou seja, estes animais têm menos p75 e mais sensibilidade ao bloqueio de TrkB no que se refere à secreção. As razões para isso exigem experimentos adicionais e qualquer interpretação destes dados seria meramente especulativa.

## CONCLUSÕES

Nosso trabalho reforça a relevância das alterações encontradas no modelo de doença de Alzheimer esporádica por STZ via ICV, quando olhamos para as diferenças entre os sexos e para a progressão do déficit colinérgico e da diminuição da captação de glicose. Outras alterações encontradas, como GFAP, S100B e GSH, acentuam o envolvimento dos astrócitos neste modelo de DA. Todas as alterações que encontramos (exceto GFAP no hipocampo) diferiram em ambos os sexos. Ainda não está claro, infelizmente, o quanto estas alterações são moduladas pelos hormônios sexuais esteroides. Como citamos anteriormente, temos algumas limitações neste estudo, entretanto, apesar disso, consideramos os resultados encontrados nesta tese importantes para entendermos melhor a suscetibilidade e a progressão da DA, no que se diz respeito às células astrogliais de hipocampo e cerebelo em ambos os sexos.

## PERSPECTIVAS

1. Realizar a ovariectomia em um grupo de ratas, infundir STZ via ICV e medir os parâmetros neurogliais investigados nos capítulos I e II a fim de comparar as respostas frente à ausência de hormônios gonadais femininos.
2. Complementar o estudo em cerebelo, realizando a quantificação de GFAP por imunistoquímica nas diferentes camadas de células gliais nas fêmeas.
3. Realizar experimentos *ex vivo* com fatias cerebelares e analisar suas respostas neurogliais.
4. Investigar a resposta astrogliial *ex vivo* do hipocampo das fêmeas frente aos tratamentos com alto potássio e BDNF, quantificando e bloqueando os demais receptores de neurotrofinas.
5. Quantificar as demais neurotrofinas e seus respectivos receptores no hipocampo dos animais (machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas) expostos(as) à STZ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAZ-FONSECA, E. et al. Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions. **Progress in Neurobiology**, v. 144, p. 5–26, set. 2016.

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. **Nature**, v. 457, n. 7230, p. 675–677, 5 fev. 2009.

ALLEN, S. J. et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 155–175, maio 2013.

ALVAREZ, M.-I. et al. Astroglial cell subtypes in the cerebella of normal adults, elderly adults, and patients with Alzheimer's disease: a histological and immunohistochemical comparison. **Glia**, v. 63, n. 2, p. 287–312, fev. 2015.

ANDREAZZA, A. C. et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, n. 6, p. 523–529, set. 2007.

ARGENTE-ARIZÓN, P. et al. Glial cells and energy balance. **Journal of Molecular Endocrinology**, 18 nov. 2016.

ARLUISON, M. et al. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 28, n. 3, p. 117–136, nov. 2004.

BALDAÇARA, L. et al. Cerebellar volume in patients with dementia. **Revista Brasileira De Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 33, n. 2, p. 122–129, jun. 2011.

BALE, T. L.; EPPERSON, C. N. Sex differences and stress across the lifespan. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1413–1420, out. 2015.

BANFIELD, M. J. et al. Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. **Structure (London, England: 1993)**, v. 9, n. 12, p. 1191–1199, dez. 2001.

BARNES, L. L. et al. Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 685–691, jun. 2005.

BARONE, E. et al. The Janus face of the heme oxygenase/biliverdin reductase system in Alzheimer disease: it's time for reconciliation. **Neurobiology of Disease**, v. 62, p. 144–159, fev. 2014.

BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science (New York, N.Y.)**, v. 217, n. 4558, p. 408–414, 30 jul. 1982.



BAUM, L. W. Sex, hormones, and Alzheimer's disease. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 60, n. 6, p. 736–743, jun. 2005.

BAYDAS, G. et al. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, n. 1-3, p. 67–71, 21 fev. 2003.

BERGAMI, M. et al. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 2, p. 213–221, 20 out. 2008.

BERGER, R. P. et al. Serum S100B concentrations are increased after closed head injury in children: a preliminary study. **Journal of Neurotrauma**, v. 19, n. 11, p. 1405–1409, nov. 2002.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, jun. 1993.

BERTSCH, T. et al. Protein S-100B: a serum marker for ischemic and infectious injury of cerebral tissue. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 39, n. 4, p. 319–323, abr. 2001.

BIASIBETTI, R. et al. Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. **Behavioural Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 186–193, 1 jan. 2013.

BIASIBETTI, R. et al. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 205–214, 1 jan. 2017.

BOHACEK, J.; BEARL, A. M.; DANIEL, J. M. Long-term ovarian hormone deprivation alters the ability of subsequent oestradiol replacement to regulate choline acetyltransferase protein levels in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 8, p. 1023–1027, ago. 2008.

BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 99–125, jun. 2005.

BREUNIG, J. J.; GUILLOT-SESTIER, M.-V.; TOWN, T. Brain injury, neuroinflammation and Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, p. 26, 2013.

BROETTO, N. et al. Intracerebroventricular administration of okadaic acid induces hippocampal glucose uptake dysfunction and tau phosphorylation. **Brain Research Bulletin**, 21 abr. 2016.

BROWN, C. A. et al. A critique of the evidence base for non-pharmacological sleep interventions for persons with dementia. **Dementia (London, England)**, v. 12, n. 2, p. 210–237, mar. 2013.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 108, p. 347–352, 1998.

BUTTERFIELD, D. A.; SULTANA, R. Methionine-35 of  $\alpha\beta(1-42)$ : importance for oxidative stress in Alzheimer disease. **Journal of Amino Acids**, v. 2011, p. 198430, 2011.

CALABRESE, V. et al. Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 11-12, p. 1975–1986, dez. 2006.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L. et al. Neuroinflammation, hyperphosphorylated tau, diffuse amyloid plaques, and down-regulation of the cellular prion protein in air pollution exposed children and young adults. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 28, n. 1, p. 93–107, 2012.

CHAO, M. V. The p75 neurotrophin receptor. **Journal of Neurobiology**, v. 25, n. 11, p. 1373–1385, nov. 1994.

CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8853–8860, 1 dez. 2000.

CORDER, E. H. et al. The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: modification by age, sex, and APOE polymorphism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, p. 24–28, jun. 2004.

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, 15 jan. 2012.

COYLE, J. T.; PRICE, D. L.; DELONG, M. R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 219, n. 4589, p. 1184–1190, 11 mar. 1983.

CUDKOWICZ, M. E. et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of Procyteine in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology**, v. 52, n. 7, p. 1492–1494, 22 abr. 1999.

CUMMINGS, J. L. et al. The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. **Neurology**, v. 44, n. 12, p. 2308–2314, dez. 1994.

CUNNANE, S. et al. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 27, n. 1, p. 3–20, jan. 2011.

DANIEL, J. M.; DOHANICH, G. P. Acetylcholine mediates the estrogen-induced increase in NMDA receptor binding in CA1 of the hippocampus and the associated improvement in working memory. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 17, p. 6949–6956, 1 set. 2001.

DAVIES, P.; MALONEY, A. J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8000, p. 1403, 25 dez. 1976.

DAVIES, W.; WILKINSON, L. S. It is not all hormones: alternative explanations for sexual differentiation of the brain. **Brain Research**, v. 1126, n. 1, p. 36–45, 18 dez. 2006.

DEAN, S. L.; MCCARTHY, M. M. Steroids, sex and the cerebellar cortex: implications for human disease. **Cerebellum (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 38–47, 2008.

DE LA MONTE, S. M. et al. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. **Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)**, v. 10, n. 10, p. 1049–1060, out. 2009.

DEUTSCH, J. A. The cholinergic synapse and the site of memory. **Science (New York, N.Y.)**, v. 174, n. 4011, p. 788–794, 19 nov. 1971.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637–668, jul. 2001.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 6, p. 540–551, 15 abr. 2003.

DONATO, R. et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 6, p. 1008–1022, jun. 2009.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 6, p. 649–671, dez. 2000.

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

DUYCKAERTS, C.; DELATOUR, B.; POTIER, M.-C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. **Acta Neuropathologica**, v. 118, n. 1, p. 5–36, jul. 2009.

EIKELENBOOM, P. et al. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 113, n. 11, p. 1685–1695, nov. 2006.

EJAZ AHMED, M. et al. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 4, p. 492–501, mar. 2013.

ELLIS, J. M. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 105, n. 3, p. 145–158, mar. 2005.

EMMERZAAL, T. L.; KILIAAN, A. J.; GUSTAFSON, D. R. 2003-2013: a decade of body mass index, Alzheimer's disease, and dementia. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 43, n. 3, p. 739–755, 2015.

FERRARI, C. et al. Imaging and cognitive reserve studies predict dementia in presymptomatic Alzheimer's disease subjects. **Neuro-Degenerative Diseases**, v. 13, n. 2-3, p. 157–159, 2014.

FILLIT, H. et al. Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type. **Psychoneuroendocrinology**, v. 11, n. 3, p. 337–345, 1986.

FLICKER, C. et al. Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 18, n. 6, p. 973–981, jun. 1983.

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, set. 2006.

FULLER, S.; MÜNCH, G.; STEELE, M. Activated astrocytes: a therapeutic target in Alzheimer's disease? **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 9, n. 11, p. 1585–1594, nov. 2009.

GIBBS, R. B. Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. **Neuroscience**, v. 101, n. 4, p. 931–938, 2000.

GONÇALVES, C.-A.; LEITE, M. C.; 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, jul. 2008.

GRUNDKE-IQBAL, I. et al. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 13, p. 6084–6089, 5 maio 1986.

GULINELLO, M. et al. Validation of a 2-day water maze protocol in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 196, n. 2, p. 220–227, 23 jan. 2009.

HARA, Y. et al. Estrogen Effects on Cognitive and Synaptic Health Over the Lifecourse. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 3, p. 785–807, jul. 2015.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5054, p. 184–185, 10 abr. 1992.

HENDERSON, V. W. et al. Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. **Archives of Neurology**, v. 51, n. 9, p. 896–900, set. 1994.

HOLMES, C. et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. **Lancet (London, England)**, v. 372, n. 9634, p. 216–223, 19 jul. 2008.

HOSOKAWA, M.; DOLCI, W.; THORENS, B. Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing beta cells to streptozotocin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 5, p. 1114–1117, 21 dez. 2001.

HOYER, S. et al. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 920, p. 256–258, 2000.

HOYER, S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, n. 1-3, p. 115–125, 19 abr. 2004.

IRVINE, K. et al. Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 34, n. 9, p. 989–998, 2012.

ISHII, K. et al. Reduction of cerebellar glucose metabolism in advanced Alzheimer's disease. **Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 38, n. 6, p. 925–928, jun. 1997.

ISHRAT, T. et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 9, p. 636–647, set. 2009.

JACK, C. R. et al. Update on the magnetic resonance imaging core of the Alzheimer's disease neuroimaging initiative. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 6, n. 3, p. 212–220, maio 2010.

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

JESSEN, K. R. Glial cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 10, p. 1861–1867, out. 2004.

KAISHO, Y. et al. Regional expression of the nerve growth factor gene family in rat brain during development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 174, n. 1, p. 379–385, 15 jan. 1991.

KALARIA, R. N. Vascular Basis for Brain Degeneration: Faltering Controls and Risk Factors for Dementia. **Nutrition reviews**, v. 68, n. Suppl 2, p. S74–S87, dez. 2010.

KÁSA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 6, p. 511–535, ago. 1997.

KATOH-SEMBA, R. et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 1, p. 34–42, jul. 1997.

KUCZEWSKI, N.; PORCHER, C.; GAIARSA, J.-L. Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity. **The European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 8, p. 1239–1244, out. 2010.

KURZ, A. F.; LAUTENSCHLAGER, N. T. The concept of dementia: retain, reframe, rename or replace? **International psychogeriatrics / IPA**, v. 22, n. 1, p. 37–42, fev. 2010.

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 (Vienna, Austria: 1996)**, v. 116, n. 10, p. 1273–1280, out. 2009.

LANNERT, H. et al. Effects of Estradiol (-17beta) on learning, memory and cerebral energy metabolism in male rats after intracerebroventricular administration of streptozotocin. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 105, n. 8-9, p. 1045–1063, 1998.

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1199–1208, out. 1998.

LAPANE, K. L. et al. Gender differences in predictors of mortality in nursing home residents with AD. **Neurology**, v. 56, n. 5, p. 650–654, 13 mar. 2001.

LAWS, K. R.; IRVINE, K.; GALE, T. M. Sex differences in cognitive impairment in Alzheimer's disease. **World Journal of Psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 54–65, 22 mar. 2016.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93–99, 30 mar. 2008.

LERANTH, C. et al. Low CA1 spine synapse density is further reduced by castration in male non-human primates. **Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)**, v. 14, n. 5, p. 503–510, maio 2004.

LERANTH, C.; HAJSZAN, T.; MACCLUSKY, N. J. Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 495–499, 14 jan. 2004.

LU, B. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. **Neuron**, v. 39, n. 5, p. 735–738, 28 ago. 2003.

LUINE, V. N. Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. **Experimental Neurology**, v. 89, n. 2, p. 484–490, ago. 1985.

LUINE, V. N. et al. Age and sex-dependent decreases in ChAT in basal forebrain nuclei. **Neurobiology of Aging**, v. 7, n. 3, p. 193–198, jun. 1986.

LUINE, V. N.; KHYLCHEVSKAYA, R. I.; MCEWEN, B. S. Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. **Brain Research**, v. 86, n. 2, p. 293–306, 21 mar. 1975.

MATSUMOTO, A.; ARAI, Y. Sex difference in volume of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. **Endocrinologia Japonica**, v. 30, n. 3, p. 277–280, jun. 1983.

MCDEVITT, M. A. et al. New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 290, n. 1-2, p. 24–30, 13 ago. 2008.

MCGEER, E. G.; SINGH, E. A.; MCGEER, P. L. Sodium-dependent glutamate binding in senile dementia. **Neurobiology of Aging**, v. 8, n. 3, p. 219–223, jun. 1987.

MEDA, L.; BARON, P.; SCARLATO, G. Glial activation in Alzheimer's disease: the role of A $\beta$  and its associated proteins. **Neurobiology of Aging**, v. 22, n. 6, p. 885–893, dez. 2001.

MERMELSTEIN, P. G. Membrane-localised oestrogen receptor alpha and beta influence neuronal activity through activation of metabotropic glutamate receptors. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 257–262, mar. 2009.

MERMELSTEIN, P. G.; MICEVYCH, P. E. Nervous system physiology regulated by membrane estrogen receptors. **Reviews in the Neurosciences**, v. 19, n. 6, p. 413–424, 2008.

MICEVYCH, P.; DOMINGUEZ, R. Membrane estradiol signaling in the brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 315–327, ago. 2009.

MIGHELI, A. et al. S-100 $\beta$  protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience Letters**, v. 261, n. 1-2, p. 25–28, 12 fev. 1999.

MRAK, R. E.; SHENG, J. G.; GRIFFIN, W. S. Correlation of astrocytic S100 $\beta$  expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 55, n. 3, p. 273–279, mar. 1996.

MUDHER, A.; LOVESTONE, S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 1, p. 22–26, jan. 2002.

NAGY, J. I.; LI, W. E. A brain slice model for in vitro analyses of astrocytic gap junction and connexin43 regulation: actions of ischemia, glutamate and elevated

potassium. **The European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 4567–4572, dez. 2000.

NARDIN, P. et al. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). **Neurochemical Research**, v. 34, n. 9, p. 1603–1611, set. 2009.

NAYEBI, A. M.; POURRABI, S.; HOSSINI, S. Testosterone ameliorates streptozotocin-induced memory impairment in male rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 6, p. 752–757, jun. 2014.

NAYLOR, R. L. et al. A discrete domain of the human TrkB receptor defines the binding sites for BDNF and NT-4. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, n. 3, p. 501–507, 1 mar. 2002.

NUMAKAWA, T. et al. Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system. **Neuroscience**, v. 239, p. 157–172, 3 jun. 2013.

OJIMA, H.; KAWAJIRI, S.; YAMASAKI, T. Cholinergic innervation of the rat cerebellum: qualitative and quantitative analyses of elements immunoreactive to a monoclonal antibody against choline acetyltransferase. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 290, n. 1, p. 41–52, 1 dez. 1989.

**OMS** | **Demencia.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>>. Acesso em: 21 nov. 2016.

ORRE, M. et al. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 12, p. 2746–2760, dez. 2014.

PAJOVIĆ, S. B.; SAICIĆ, Z. S. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. **Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 57, n. 6, p. 801–811, 2008.

PATAPOUTIAN, A.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 3, p. 272–280, jun. 2001.

PATRICK, G. N. et al. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 615–622, 9 dez. 1999.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1077–1098, out. 2014.

PELLERIN, L. How astrocytes feed hungry neurons. **Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 1, p. 59–72, ago. 2005.

PEREA, G.; ARAQUE, A. GLIA modulates synaptic transmission. **Brain Research Reviews**, v. 63, n. 1-2, p. 93–102, maio 2010.



PESKIND, E. R. et al. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 39, n. 5-6, p. 409–413, dez. 2001.

PHOENIX, C. H. et al. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Endocrinology**, v. 65, p. 369–382, set. 1959.

PING, S. E. et al. Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons and spatial learning. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 7, p. 1588–1598, 15 maio 2008.

PINTO, S. S. et al. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. **FEBS letters**, v. 486, n. 3, p. 203–207, 15 dez. 2000.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 24–32, jan. 2001.

POPE, S. A. S.; MILTON, R.; HEALES, S. J. R. Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 7, p. 1410–1418, jul. 2008.

PRICKAERTS, J.; FAHRIG, T.; BLOKLAND, A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 102, n. 1-2, p. 73–88, jul. 1999.

RADEMAKERS, R.; ROVELET-LECRUX, A. Recent insights into the molecular genetics of dementia. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 451–461, ago. 2009.

RAI, S. et al. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 117, p. 104–117, fev. 2014.

RAZ, L. et al. Rapid estrogen signaling in the brain. **Neuro-Signals**, v. 16, n. 2-3, p. 140–153, 2008.

REIMAN, E. M. et al. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 12, p. 752–758, 21 mar. 1996.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 8–30, jan. 2014.

RITCHIE, K.; LOVESTONE, S. The dementias. **Lancet (London, England)**, v. 360, n. 9347, p. 1759–1766, 30 nov. 2002.

ROBSON, M. J. et al. Jugular bulb oxyhemoglobin desaturation, S100beta, and neurologic and cognitive outcomes after coronary artery surgery. **Anesthesia and Analgesia**, v. 93, n. 4, p. 839–845, out. 2001.

RODRIGUES, L. et al. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 17, n. 1, p. 193–202, 2009.

RODRÍGUEZ-ARELLANO, J. J. et al. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. **Neuroscience**, 14 jan. 2015.

ROMNER, B. et al. Traumatic brain damage: serum S-100 protein measurements related to neuroradiological findings. **Journal of Neurotrauma**, v. 17, n. 8, p. 641–647, ago. 2000.

ROTHERMUNDT, M. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 6, p. 614–632, 15 abr. 2003.

RUDICK, C. N.; GIBBS, R. B.; WOOLLEY, C. S. A role for the basal forebrain cholinergic system in estrogen-induced disinhibition of hippocampal pyramidal cells. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 11, p. 4479–4490, 1 jun. 2003.

RUSZKIEWICZ, J. A. et al. Sex- and structure-specific differences in antioxidant responses to methylmercury during early development. **Neurotoxicology**, v. 56, p. 118–126, set. 2016.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 4, p. 1005–1015, fev. 2006.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **Journal of Neural Transmission. Supplementum**, n. 72, p. 217–233, 2007.

SCHINDER, A. F.; POO, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 12, p. 639–645, dez. 2000.

SCHMAHMANN, J. D. Cerebellum in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: not a silent bystander. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 139, n. Pt 5, p. 1314–1318, maio 2016.

SEGAL, R. A. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. **Annual Review of Neuroscience**, v. 26, p. 299–330, 2003.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 3, n. 1, p. 75–80, fev. 2001.

SERRANO-POZO, A. et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a006189, set. 2011.

SEYEDREZA, P.; ALIREZA, M. N.; SEYEDEBRAHIM, H. Role of testosterone in memory impairment of Alzheimer disease induced by Streptozotocin in male rats. **Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 98, 2012.

SHARP, E. S.; GATZ, M. Relationship between education and dementia: an updated systematic review. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 25, n. 4, p. 289–304, dez. 2011.

SHASHOUA, V. E.; HESSE, G. W.; MOORE, B. W. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. **Journal of Neurochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1536–1541, jun. 1984.

SIM, Y.-J. Treadmill exercise alleviates impairment of spatial learning ability through enhancing cell proliferation in the streptozotocin-induced Alzheimer's disease rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 10, n. 2, p. 81–88, 30 abr. 2014.

SMALL, G. W. et al. Predictors of cognitive change in middle-aged and older adults with memory loss. **The American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 12, p. 1757–1764, dez. 1995.

SMITH, S. S. Estrogen administration increases neuronal responses to excitatory amino acids as a long-term effect. **Brain Research**, v. 503, n. 2, p. 354–357, 4 dez. 1989.

SOFIC, E. et al. Brain catalase in the streptozotocin-rat model of sporadic Alzheimer's disease treated with the iron chelator-monoamine oxidase inhibitor, M30. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 122, n. 4, p. 559–564, abr. 2015.

STEELE, M. L.; ROBINSON, S. R. Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 2, p. 423.e1–13, fev. 2012.

STOVER, K. R. et al. Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 289, p. 29–38, 1 ago. 2015.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; ALLAN BUTTERFIELD, D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 62, p. 157–169, set. 2013.

SWAROWSKY, A. et al. Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. **Behavioural Brain Research**, v. 190, n. 2, p. 206–211, 19 jul. 2008.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 50, n. 6, p. 537–546, 2001.

TAHIROVIC, I. et al. Brain antioxidant capacity in rat models of betacytotoxic-induced experimental sporadic Alzheimer's disease and diabetes mellitus. **Journal of Neural Transmission. Supplementum**, n. 72, p. 235–240, 2007.

TOLPPANEN, A.-M. et al. Leisure-time physical activity from mid- to late life, body mass index, and risk of dementia. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 11, n. 4, p. 434–443.e6, abr. 2015.

TRAMONTINA, A. C. et al. The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 118, n. 11, p. 1641–1649, nov. 2011.

TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 282–286, 15 maio 2007.

UCHIGATA, Y. et al. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 11, p. 6084–6088, 10 jun. 1982.

VAN ELDIK, L. J.; GRIFFIN, W. S. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1223, n. 3, p. 398–403, 29 set. 1994.

VERKHRATSKY, A. et al. Astrocytes in Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 399–412, out. 2010.

VICENTE, E. et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Brain Research**, v. 1251, p. 204–212, 28 jan. 2009.

VIÑA, J.; LLORET, A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 20 Suppl 2, p. S527–533, 2010.

WARTCHOW, K. M. et al. Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 6, p. 1420–1429, jun. 2016.

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 (Vienna, Austria: 1996)**, v. 111, n. 3, p. 347–366, mar. 2004.

WIESMANN, C. et al. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. **Nature**, v. 401, n. 6749, p. 184–188, 9 set. 1999.

WILCOCK, D. M.; GRIFFIN, W. S. T. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 84, 2013.

YOSHIZAWA, H. et al. Characterizing the normative profile of 18F-FDG PET brain imaging: sex difference, aging effect, and cognitive reserve. **Psychiatry Research**, v. 221, n. 1, p. 78–85, 30 jan. 2014.

ZUSSY, C. et al. Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid  $\beta$  fragment in rats. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 315–334, jul. 2011.