

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

Bruna Schultz Bandeira

**AVALIAÇÃO DE PROTEASES HIPOCAMPAIS QUE ATUAM SOBRE O
PEPTÍDEO β A, EM UM MODELO ESPORÁDICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Porto Alegre

2020

Bruna Schultz Bandeira

**AVALIAÇÃO DE PROTEASES HIPOCAMPAIS QUE ATUAM SOBRE O
PEPTÍDEO β A, EM UM MODELO ESPORÁDICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre

2020

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Sandra e Eduardo e minha irmã Nádia, os quais sempre me incentivaram e me apoiaram a estudar, sempre fazendo tudo que fosse possível para eu ter a educação que tenho hoje e para estar concluindo mais esta etapa.

Ao Leonardo, pelo apoio de anos e participação neste trabalho, desde o momento de escrita do projeto, aos experimentos no laboratório e agora na finalização desta dissertação, sempre disposto a conversar e contribuir.

À minha melhor amiga Taisa, que sempre me apoiou mesmo a distância e sempre esteve presente todas as vezes que precisei.

Ao professor Carlos Alberto, por ser um ótimo orientador, sempre disposto a conversar e ensinar e pela oportunidade da realização deste mestrado em seu laboratório.

À Lílian, pela paciência e por toda ajuda na realização desta pesquisa, sempre disposta a ensinar e explicar todas as vezes que precisei, mesmo longe em razão do intercâmbio.

À todos os colegas do laboratório 33 que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	4
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 ENVELHECIMENTO E DEMÊNCIA.....	5
1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	6
1.3 ASTRÓCITOS E DOENÇA DE ALZHEIMER.....	8
1.4 NEPRILISINA (NEP).....	10
1.5 ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA (IDE).....	11
1.6 MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
PARTE II	15
CAPÍTULO I	16
3 MATERIAS E MÉTODOS	16
3.1 ANIMAIS.....	16
3.2 INDUÇÃO DO MODELO.....	17
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	17
3.4 TESTE COMPORTAMENTAL.....	19
3.5 EUTANÁSIA, OBTENÇÃO DO LCR E HIPOCAMPO.....	20
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	20
3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	21
3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	21
3.9 WESTERN BLOTTING.....	22
3.10 IMUNODETECÇÃO.....	22
3.11 CONTEÚDO DE β A.....	23
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
CAPÍTULO II	25
4 RESULTADOS	25
4.1 AVALIAÇÃO COGNITIVA.....	25

4.2 CONTEÚDO DE β A	26
4.2.1 LCR	26
4.2.2 Hipocampo	27
4.3 CONTEÚDO DE NEP	28
4.4 CONTEÚDO DE IDE.....	29
PARTE III	30
5 DISCUSSÃO	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS	39
LISTA DE FIGURAS E TABELA	44

PARTE I

RESUMO

O envelhecimento populacional é um fenômeno global de acordo com um relatório das Nações Unidas sobre a idade da população mundial. Em 2019, haviam 703 milhões de pessoas com 65 anos ou mais no mundo, o equivalente a 9% da população mundial. Demência é uma das principais causas de dependência e incapacidade de idosos no mundo, sendo a Doença de Alzheimer a causa mais comum, responsável por 60-70% dos casos. Neste trabalho estudamos a DA do tipo esporádica induzindo um modelo animal através da administração ICV-STZ. Nossos resultados mimetizaram características comportamentais e neuroquímicas da doença, sendo que observamos um déficit cognitivo no teste comportamental e um aumento do conteúdo de βA_{42} no hipocampo. Ainda avaliamos no hipocampo as principais enzimas responsáveis por sua depuração, NEP e IDE. Constatamos que o conteúdo de NEP está relacionado com os níveis de βA , mas não observamos correlações entre o conteúdo de IDE e βA neste trabalho. Estes achados corroboram relatos de que a NEP seria a principal protease envolvida na degradação do βA . Entretanto são necessários mais estudos acerca das enzimas envolvidas na sua depuração.

ABSTRACT

Population aging is a global phenomenon according to a United Nations report about the world's population age. In 2019, there were 703 million people aged 65 and over in the world, equivalent to 9% of the world population. Dementia is one of the main causes of dependency and disability among the elderly worldwide, with Alzheimer's disease being the most common cause, responsible for 60-70% of cases. In this work, we studied sporadic AD inducing an animal model through ICV-STZ administration. Our results mimicked behavioral and neurochemical characteristics of the disease, as we observed a cognitive deficit in the behavioral test, and an increase in the content of β A42 in the hippocampus. We also evaluated the main enzymes responsible for its clearance, NEP and IDE. We found that the content of NEP is related to the levels of β A, but we did not observe correlations between the content of IDE and β A in this study. These findings corroborate to reports that NEP would be the main protease involved in the degradation of β A. However, further studies are needed on the enzymes involved in its clearance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APP - Proteína precursora de amiloide

β A - β -amilóide

CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais

DA - Doença de Alzheimer

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

GLUT2 - Transportador de glicose do tipo II

IDE - Enzima degradadora de insulina

ICV - Injeção intracerebroventricular

LCR - Líquido cefalorraquidiano

NEP - Neprilisina

PSEN1 - Presenilina 1

PSEN2 - Presenilina 2

SNC - Sistema nervoso central

STZ - Estreptozotocina

TA - Temperatura ambiente

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO E DEMÊNCIA

O envelhecimento populacional é um fenômeno global, de acordo com um relatório das Nações Unidas sobre a idade da população mundial. Em 2019, haviam 703 milhões de pessoas com 65 anos ou mais no mundo, o equivalente a 9% da população mundial. Prevê-se que o número de idosos dobre para 1,5 bilhões em 2050, aumentando para 16% a proporção de idosos no mundo, de modo que uma em cada 6 pessoas terão 65 anos ou mais em 2050 (UN DESA'S POPULATION DIVISION, 2019)

O envelhecimento é um processo biológico natural que envolve uma série de alterações no organismo e redução da sua capacidade funcional. Uma mudança importante durante o envelhecimento é a perda de células insubstituíveis. No cérebro, os neurônios encolhem e ocorrem alterações nas sinapses e redes neuronais. A perda de neurônios, pode contribuir para certas alterações fisiológicas, incluindo metabolismo alterado, que pode estar associado a um declínio cognitivo em idosos (HUNG et al., 2010).

A alteração dos mecanismos moleculares do envelhecimento, é um importante fator de risco para doenças neurodegenerativas e pode contribuir para a patogênese destas doenças prejudicando a capacidade de auto reparo do organismo. Em muitas doenças neurodegenerativas relacionadas à idade há um acúmulo de proteínas específicas da doença no sistema nervoso central (SNC). Por exemplo, na Doença de Alzheimer (DA) há o acúmulo de peptídeos β -amilóides (β A) e proteínas tau fosforiladas (HUNG et al., 2010; WYSS-CORAY, 2016)

Demência é uma das principais causas de dependência e incapacidade de idosos no mundo, na qual há deterioração da função cognitiva. Ela afeta a memória, pensamento, orientação, capacidade de aprendizado e de realizar tarefas cotidianas. Cerca de 50 milhões de pessoas no mundo tem algum tipo de demência e há cerca de 10 milhões de novos casos por ano, sendo a DA a causa mais comum, responsável por 60-70% dos casos de demência no mundo. Estima-se que em 2050 haverá 152 milhões de pessoas vivendo com algum tipo de demência (BALSINHA et al., 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018)

1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é caracterizada por uma progressiva desordem neurológica que leva à perda de memória e de diversas funções cognitivas (BIASIBETTI et al., 2017; SORIAL; EL SAYED, 2017). Além do envelhecimento, o estilo de vida, obesidade, diabetes, tabagismo, e até mesmo um baixo nível educacional são fatores de risco que podem contribuir para seu desenvolvimento (BLENNOW; DE LEON; ZETTERBERG, 2006; REITZ; MAYEUX, 2014).

A DA pode ser dividida em dois tipos: DA familiar e DA esporádica. A forma mais comum da doença é a esporádica e em sua maioria afeta pessoas com idade acima de 65 anos, sendo responsável por mais de 90% dos casos da doença (BIASIBETTI et al., 2017; NAGATA et al., 2018).

A DA do tipo familiar está associada com mutações nos genes da cascata amiloide, genes da APP e da Presenilina 1 e 2 (PSN1, PSEN2). A DA do tipo esporádica pode ser desencadeada pela exposição ambiental, como dieta, exposição toxicológica, fatores hormonais, entre outros. E por alterações a nível molecular

(metilação, dano oxidativo, entre outros) em certos genes, como por exemplo o gene da Apo E, que em um organismo em envelhecimento com um sistema de reparo menos eficiente, pode desencadear uma doença neurodegenerativa (DORSZEWSKA et al., 2016)

Na DA, do ponto de vista macroscópico, há atrofia do hipocampo e do córtex cerebral. Microscopicamente, é possível observar a presença extracelular de agregados de peptídeo β -amiloide os quais formam as placas senis, bem como pelos emaranhados neurofibrilares intracelulares, alterações colinérgicas principalmente no hipocampo e distúrbios no metabolismo da glicose devido à sinalização da insulina (BIASIBETTI et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018; DOS SANTOS PICANCO et al., 2016; RIES; SASTRE, 2016)

A formação da placa β -amiloide é proveniente de um desequilíbrio nas vias de produção e depuração da proteína precursora de amiloide (APP – do inglês *amyloid precursor protein*), uma proteína transmembrana que em condições fisiológicas é clivada preferencialmente pela α -secretase e após pela γ -secretase. Em condições patológicas antes de ser clivada pela γ -secretase esta proteína é clivada predominantemente pela β -secretase gerando assim o peptídeo β -amilóide (DETURE; DICKSON, 2019; DUYNCKAERTS; DELATOUR; POTIER, 2009; HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015; VETRIVEL; THINAKARAN, 2010).

O peptídeo βA_{42} é o componente predominante na placa amiloide e também o mais fibrilogênico. Esses peptídeos de 4kDa se desdobram na conformação de folha β que são altamente fibrilogênicas, formando assim a placa amiloide (DETURE; DICKSON, 2019).

Outra característica da DA são os emaranhados neurofibrilares compostos principalmente da proteína Tau. Em condições fisiológicas a proteína Tau é responsável pela estabilização dos microtúbulos. Na DA esta proteína é hiperfosforilada e agregada formando os emaranhados neurofibrilares no corpo dos neurônios. A hiperfosforilação da proteína Tau compromete sua função desestabilizando os microtúbulos e contribuindo para a neurodegeneração da DA (GÖTZ; ITTNER, 2008; LAURENT; BUÉE; BLUM, 2018).

1.3 ASTRÓCITOS E DOENÇA DE ALZHEIMER

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC, possuem relevante plasticidade adaptativa e são fundamentais para manutenção do SNC. Eles desempenham diversas funções incluindo, modulação: da transmissão sináptica, de neurotransmissores, da atividade metabólica e da regulação de íons, exercendo um importante papel na homeostasia cerebral, na neurogênese, na regulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica e na defesa do SNC (KAMPHUIS et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2009)

Os astrócitos se tornam reativos em resposta a insultos no SNC e sofrem alterações funcionais e morfológicas, gerando uma hipertrofia e um aumento na expressão de proteínas sinalizadoras, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proteína S100B (HENEKA et al., 2015; KAMPHUIS et al., 2014; SOFRONIEW; VINTERS, 2010)

A GFAP é o principal filamento intermediário dos astrócitos e é considerada um marcador altamente específico de astrócitos reativos. Suas funções incluem, a formação de uma barreira física, ocasionando o isolamento do tecido danificado e

sustentação mecânica dos astrócitos. Sua expressão é aumentada devido à neurodegeneração da DA (BRENNER, 2014; HOL et al., 2003; ISHIKI et al., 2016; MCKEON; BENARROCH, 2018)

A S100B é uma proteína ligante de Ca^{2+} , no SNC, é capaz de modular o ciclo celular, o metabolismo energético, inibir a apoptose, atuar na sinalização intracelular, como um mensageiro extracelular e modular a sinalização de Ca^{2+} nos astrócitos. Os astrócitos produzem e secretam S100B, que podem ter efeitos neuroprotetores ou neurotóxicos (BIASIBETTI et al., 2017; CHAVES et al., 2010; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018)

Esta proteína também possui um papel modulador na neuroinflamação, incluindo na DA, e sua expressão pode mudar substancialmente em condições patológicas. Devido ao alto nível de expressão de S100B nestas condições, ela é universalmente utilizada como um marcador astrocitário de dano neurológico (CHAVES et al., 2010; GULOKSUZ et al., 2017; IRAM; FRENKEL, 2012; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018).

Na DA, o número de astrócitos reativos aumenta e eles circundam a placa amiloide sendo capazes de internalizar e degradar peptídeos βA , reduzindo a placa e contribuindo para a remoção do peptídeo no espaço extracelular. O acúmulo de βA , também induz os astrócitos a produzirem mediadores inflamatórios, promovendo um feedback positivo na reatividade astrocitária (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009; VALLES et al., 2019; XIA et al., 2018)

A neuroinflamação é uma característica das doenças neurodegenerativas e desempenha um papel ativo no desenvolvimento e progressão da DA. Inicialmente os astrócitos possuem um papel neuroprotetor, degradando e captando o βA . Conforme

a doença avança há uma redução da depuração de β A o que contribui para uma exacerbação da função astrocitária. A perda de função dos astrócitos na DA e as respostas inflamatórias mediadas por eles implicam no comprometimento da neurogênese e da sinaptogênese, contribuindo para neurodegeneração na DA (PHILLIPS et al., 2014; SIRACUSA; FUSCO; CUZZOCREA, 2019)

O hipocampo é uma estrutura cerebral relacionada com aprendizado e memória, sendo especialmente vulnerável a danos nos estágios iniciais da DA. Estima-se que no hipocampo um único astrócito entre em contato com centenas de dendritos de vários neurônios e envolvam 100 mil ou mais sinapses (SOFRONIEW; VINTERS, 2010) A neurogênese do hipocampo exerce um papel importante na plasticidade estrutural e na manutenção da rede, desse modo, manifestações sutis precoces da DA podem contribuir para o comprometimento da memória nesta doença (MU; GAGE, 2011).

1.4 NEPRILISINA (NEP)

A NEP é uma metaloendopeptidase dependente de zinco, constituída por 742 aminoácidos e de peso molecular que varia entre 85 a 110 kDa, de acordo com as diferenças em sua glicosilação (GRIMM et al., 2013). É sintetizada no complexo de Golgi e transportada para a membrana celular. A NEP é uma proteína de membrana integral do tipo II e possui um domínio citosólico N-terminal curto, uma porção transmembrana única, seguido de um grande domínio C-terminal extracelular que contém o sítio ativo da enzima (BARANELLO et al., 2015; BAYES-GENIS; BARALLAT; RICHARDS, 2016).

A NEP é expressa principalmente no cérebro, mas também pode ser encontrada em outros órgãos como rins, pulmões, entre outros (BARANELLO et al., 2015). No SNC, a NEP é expressa principalmente por neurônios e está localizada principalmente em terminais pré-sinápticos e axônios, especialmente em neurônios hipocámpais e neocorticais, também podendo ser encontrada em astrócitos reativos e micróglia (GRIMM et al., 2013; RIES; SASTRE, 2016; ZHANG et al., 2017). A NEP está envolvida na modulação de neuropeptídeos, clivando encefalinas, substância P, neuropeptídeo Y, taquicininas, bradicinina e somatostatina (GRIMM et al., 2013).

A degradação proteolítica é uma importante via de depuração do peptídeo β A. Dentre as enzimas capazes de degradar o β A, a NEP é a mais relevante para o controle de seus níveis no SNC (MARR; HAFEZ, 2014). Ela é capaz de clivar ambos os peptídeos, β A₄₀ e β A₄₂, no entanto, a capacidade da NEP de degradar formas oligoméricas de β A é discutível (GRIMM et al., 2013; ZHANG et al., 2017).

1.5 ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA (IDE)

A IDE é uma metaloendopeptidase dependente de zinco de peso molecular de 110 kDa, sendo composta por 4 domínios com estrutura similar, dobrados em forma de concha (DELIKKAYA et al., 2019; SONG; RODGERS; HERSH, 2018). A IDE é expressa em vários tecidos, como no cérebro, fígado e músculos (TUNDO et al., 2013).

No, SNC ela é expressa principalmente nos neurônios do hipotálamo, hipocampo, cerebelo e tronco cerebral e também é encontrada em células da glia, como astrócitos (RIES; SASTRE, 2016). A IDE está situada principalmente no citosol da célula, mas também pode ser encontrada na mitocôndria, endossomos e

peroxissomos (SONG; RODGERS; HERSH, 2018). Alguns trabalhos relatam que a IDE pode ser secretada no meio extracelular, no entanto, ainda não é bem estabelecido se ela realmente é secretada ou se é liberada em células danificadas (BARANELLO et al., 2015; SONG; RODGERS; HERSH, 2018).

A IDE é capaz de clivar uma diversidade de peptídeos, entre eles, insulina, glucagon, peptídeo natriurético, somatostatina e peptídeo β A (BARANELLO et al., 2015; TUNDO et al., 2013). Juntamente com a NEP, a IDE tem sido relatada como uma importante enzima capaz de degradar os peptídeos β A₄₀ e β A₄₂, entretanto, a IDE possui uma maior capacidade de degradar formas oligoméricas. (KUROCHKIN; GUARNERA; BEREZOVSKY, 2018; SONG; RODGERS; HERSH, 2018).

1.6 MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Na DA do tipo esporádica, há evidências que a sinalização de insulina e o metabolismo da glicose estão prejudicados. Níveis reduzidos de insulina e de seus receptores são observados em cérebros com DA. Deste modo, tem sido descrito que alterações na sinalização de insulina podem estar estreitamente relacionada com a disfunção cognitiva e a neurodegeneração da DA (GABBOUJ et al., 2019; NAZEM et al., 2015; SHIEH; HUANG; LIN, 2020).

A estreptozotocina (STZ) é um composto derivado de bactérias, que é comumente utilizado para induzir diabetes em modelos animais. Este composto é altamente tóxico para células que expressam proteínas transportadoras de glicose do tipo II (GLUT2), pois sua captação por meio deste transportador leva à alquilação do DNA, resultando em apoptose. Desta forma, o STZ é altamente citotóxico para as células β -pancreáticas e para outros tecidos que expressam GLUT2 (GRIEB, 2016).

O STZ, quando administrado por meio de injeção intracerebroventricular (ICV), leva à diminuição da captação de glicose no cérebro através da dessensibilização dos receptores de insulina cerebral, no entanto este mecanismo de ação do ICV-STZ ainda precisa ser melhor compreendido (GRIEB, 2016). Neste modelo, os animais desenvolvem neuroinflamação, características patológicas da DA e déficit cognitivo após uma única injeção ICV-STZ na dose de 3mg/Kg (NAZEM et al., 2015).

Tendo em vista o modelo de ICV-STZ como um modelo de DA do tipo esporádica e NEP e IDE como as principais enzimas responsáveis pela depuração de β A, se faz necessário uma melhor compreensão de seus papéis na patogênese desta doença neste modelo (BARANELLO et al., 2015; SORIAL; EL SAYED, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração intracerebroventricular de STZ e o conteúdo da NEP e IDE em ratos Wistar adultos e relacionar com os níveis de peptídeos β A, avaliando em paralelo outros marcadores de reatividade astrogliar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o conteúdo de NEP e IDE no hipocampo em diferentes tempos (2, 4, 8 e 16 semanas) após administração ICV-STZ;
- Analisar o conteúdo de β A₄₂ no hipocampo e líquido cefalorraquidiano (LCR);
- Avaliar o conteúdo de GFAP e S100B no hipocampo;
- Avaliar o comportamento de possíveis déficits cognitivos através do teste de reconhecimento de objetos.

PARTE II

CAPÍTULO I

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Como modelo animal para este estudo foram utilizados ratos machos da colônia Wistar com 90 dias de idade provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Este estudo foi realizado após avaliação e aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da UFRGS, sob normas de ética para pesquisa em modelos animais, com cuidados especiais para a utilização do menor número destes e para minimizar qualquer tipo de dor e sofrimento.

Todos os procedimentos realizados estiveram de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), pelas diretrizes do CONCEA que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais entre outras providências, e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

Os animais foram mantidos e criados de acordo com o padrão sanitário convencional no Biotério de Departamento de Bioquímica da UFRGS em condições ambientais e climáticas controladas com ciclos de luz claro/escuro a cada 12h (7h às 19h) e em temperatura controlada (21 a 24°C) com acesso livre a água *ad libitum* e a ração balanceada padrão (50% carboidrato, 22% proteína e 4% lipídio) para roedores.

Como a altura das caixas para alojamento dos animais do biotério deste departamento não está em total acordo com a Resolução Normativa Nº15 de 16 de dezembro de 2016 do CONCEA, devido à ausência da verba necessária para compra destas caixas no momento, acomodamos menos animais por caixa (3 animais/caixa

de dimensões 410 x 340 x 160 mm; 1110 cm²; 14,5 cm altura) em cama de maravalha de *pinus* selecionada e autoclavada.

3.2 INDUÇÃO DO MODELO

Os animais foram divididos em 2 principais grupos: O grupo STZ que recebeu uma injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (3mg/kg) bilateral no volume total de 5 µL/ventrículo e o grupo *SHAM* que recebeu a ICV de solução salina (NaCl 0.9%) (BIASIBETTI et al., 2017).

No dia do procedimento os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de cetamina (75 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg) e posicionados em um aparelho estereotáxico. Em seguida foi realizada uma incisão na parte superior da cabeça do animal os ventrículos foram acessados utilizando as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior a bregma; 1,5 mm lateral à sutura sagital; 3,6 mm abaixo da superfície do cérebro, sendo realizada uma única infusão bilateral (BIASIBETTI et al., 2017).

Após a cirurgia os animais foram cobertos com um pano para manter a temperatura corporal em 37°C e mantidos nesse local até a recuperação da anestesia. Após este tempo eles foram colocados em suas caixas, totalizando 3 animais por caixa.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Após o procedimento de indução do modelo, os animais foram organizados em 8 grupos, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Organização dos grupos experimentais.

Grupos	Tempo de eutanásia pós indução do modelo (semanas)
SHAM e STZ	2
	4
	8
	16

Transcorrido 2, 4, 8 e 16 semanas após o procedimento de indução do modelo, o teste comportamental foi realizado e os animais eutanasiados para obtenção das amostras.

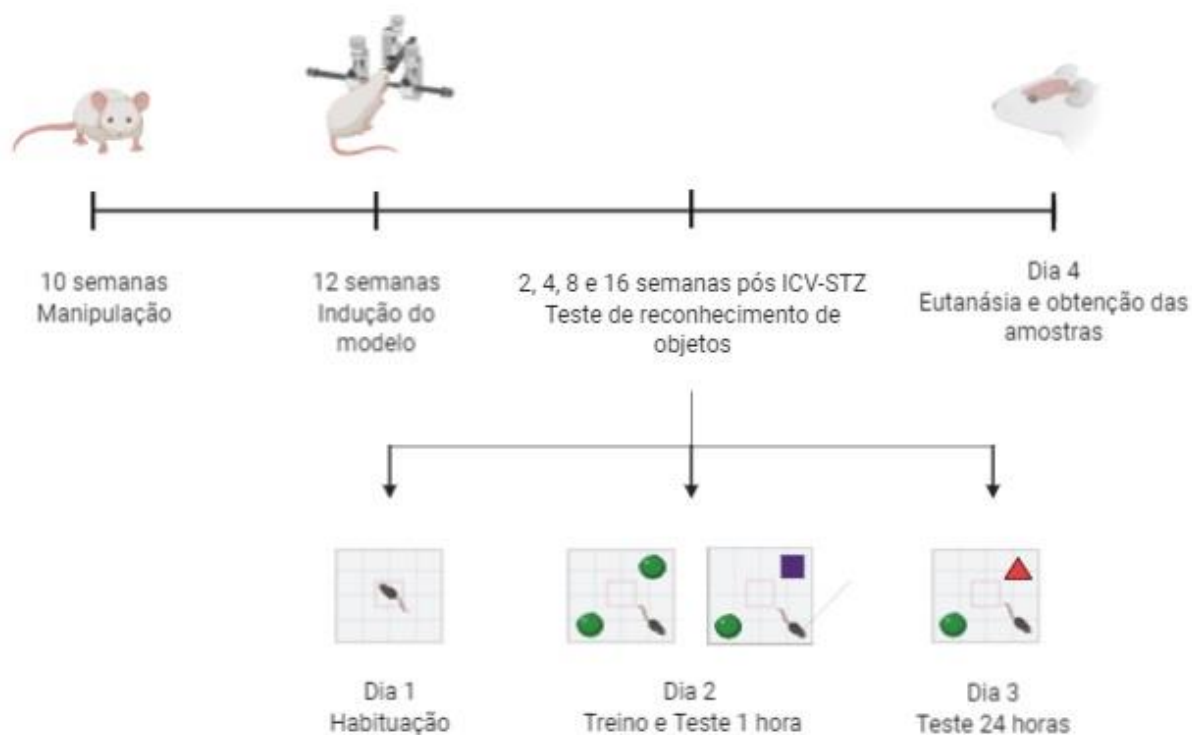


Figura 1: Desenho experimental. A figura mostra o cronograma de execução dos experimentos, incluindo o tempo de habituação e manuseio dos animais, procedimento cirúrgico para indução do modelo, teste de reconhecimento de objeto, esse último dividido em suas três etapas e por último a eutanásia e coleta de amostras.

3.4 TESTE COMPORTAMENTAL

Em 2, 4, 8 e 16 semanas pós indução do modelo, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos onde foi avaliado o aprendizado e a memória do animal como descrito por BIASIBETTI, et al., (2017).

O teste de reconhecimento de objeto é um teste comportamental de memória que depende principalmente do comportamento exploratório inato de um roedor. Este teste compreende três fases, a primeira é a habituação, os ratos foram colocados no centro do aparelho para que fosse permitido explorar a área na ausência de objetos. No treinamento, 24h após a primeira fase, os ratos retornaram ao aparelho que continha dois objetos idênticos em forma, tamanho e cor. A fase de teste foi realizada 1h e 24h após o treinamento, onde os ratos retornaram ao aparelho para testar a memória de curto prazo ou a longo prazo. O aparelho continha dois objetos: um objeto idêntico à sessão de treino e um outro objeto diferente. Cada sessão teve duração de 5 minutos e foi realizada em um aparelho de campo aberto com cada lado medindo 50 cm.

Os objetos foram colocados em diagonal na zona periférica do aparato a 10 cm de distância da parede e os animais foram colocados de costas para o centro e para os objetos. Entre um animal e outro, o aparato foi limpo com solução de etanol 70% e seco com papel toalha.

O tempo gasto pelos ratos em explorar os objetos foi monitorado por um sistema de vídeo. A exploração de um objeto foi definida quando o animal cheirou ou tocou o objeto com o focinho (distância ≤ 2 cm) e/ou patas dianteiras. Para avaliar a performance cognitiva do animal foi calculado o índice de reconhecimento de cada

sessão da seguinte forma: tempo explorando o novo objeto / tempo explorando ambos os objetos.

3.5 EUTANÁSIA, OBTENÇÃO DO LCR E HIPOCAMPO

Para obtenção das amostras, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e então posicionados em um aparelho estereotáxico. O LCR foi obtido por uma punção na cisterna magna usando uma seringa de insulina (27 gauge (G) x ½ polegada). As amostras foram congeladas a -20°C para posteriores análises.

Em seguida, os animais foram eutanasiados por decapitação e para minimizar o estresse, os procedimentos foram realizados individualmente por operador treinado em ambiente tranquilo na ausência de outros animais. Após, os cérebros foram removidos e colocados em uma solução de tampão fosfato de sódio (51,33 mM de NaCl; 19,13 mM de NaH₂PO₄.H₂O; 81,01 mM de Na₂HPO₄; pH 7,4). O hipocampo foi dissecado e amostras deste foram obtidas através de um equipamento de corte (McIlwain Tissue Chopper). As amostras foram congeladas a -80°C para posteriores análises.

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de hipocampo obtidas foram submetidas ao procedimento de desnaturação proteica a fim de obter as proteínas em suas estruturas nativas. De acordo com o protocolo estabelecido no laboratório, no tubo contendo 4 fatias hipocampais, foram adicionados 100 µL de tampão de amostra "A" (SDS 10%; EDTA a 100 mM; solução de hidroximetil-aminometano (TRIS) a 500 mM em pH 6,8; e água Milli-Q®) e em seguida levado à fervura em um recipiente adequado contendo água

≈96 °C (±2 °C) por 8 minutos. Logo após, as amostras foram transferidas para novos tubos a fim de obter um volume final padrão.

No intuito de fornecer um ambiente reduzido para as proteínas, foi adicionado às amostras 25% (do volume total da amostra) de um novo tampão (tampão de amostra "B" - glicerol 100%; solução TRIS a 500 mM em pH 6,8; azul de bromofenol; água Milli-Q®) juntamente com 5% (do volume total da amostra) de β-mercaptoetanol.

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação do total de proteínas presente em cada amostra foi feita utilizando o método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Em uma placa de 96 poços foram aplicados 5 µL de cada amostra. Foi adicionado em cada poço um volume de 100 µL do reagente de Lowry e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente (TA). Em seguida, foi adicionado em cada poço um total de 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu com incubação de 30 minutos em TA. Como padrão de proteína, foi feita uma curva de calibração a partir de quantidades crescentes de solução de albumina (1 mg/mL). O cálculo do total de proteínas foi feito através do fator de calibração médio obtido na curva de calibração. A concentração de proteínas foi expressa em µg/µL.

O volume de amostra para realização da eletroforese foi determinado em relação à quantidade total de proteínas. Em cada poço na eletroforese foi aplicado 20 µg de proteína.

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e corridas em gel 12%

(acrilamida 40%; solução TRIS a 1,5 M em pH 8,8; SDS 1%; glicerol 100%; água Milli-Q®; TEMED, persulfato de amônio 10%).

A corrida foi realizada em uma cuba vertical com tampão de eletroforese (TRIS a 25 mM; glicina a 190 mM; SDS 90% a 4,24 mM). Foi aplicado 20 µg de proteína em cada poço. A corrida seguiu a seguinte programação: tensão de 180 V e corrente de ≈240 mA durante 1h.

3.9 WESTERN BLOTTING

Após a eletroforese, o gel contendo as proteínas separadas foi mergulhado em solução de Bjerrum (TRIS 48 mM; glicina 38 mM; metanol 20%) para retirar o excesso de SDS. O sistema de transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose foi montado utilizando um sistema semi-dry (Bio-Rad®) no formato de “sanduíche” (papel filtro; membrana de nitrocelulose; gel; papel filtro), e os componentes deste foram previamente imersos em solução Bjerrum. Para a realização da transferência, uma tensão de 15 V e corrente de ≈192 mA foi aplicada ao longo de 1h.

3.10 IMUNODETECÇÃO

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas (albumina 2% em T-TBS (do inglês – Tween-Tris Buffered Saline – NaCl a 500 mM; TRIS a 30 mM; Tween 20 a 0,05%; água Milli-Q®; pH 7,5)) em câmara fria (4 °C) overnight. Em seguida, foram lavadas 3 vezes por 5 min com T-TBS e incubadas com os anticorpos primários para as proteínas de interesse, NEP e IDE. No caso, foram utilizados rabbit anti-NEP (1:5.000) (Merck Millipore) e rabbit anti-IDE (1:10.000) (Merck Millipore). As diluições

dos anticorpos foram feitas em solução de T-TBS. A incubação de cada anticorpo primário foi feita a 4 °C e overnight.

Passado o tempo de incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 min com T-TBS e após incubadas a 4°C durante 1h com o respectivo anticorpo secundário HRP (do inglês – Horseradish Peroxidase): anti-rabbit. A diluição utilizada foi 1:10.000 em T-TBS. Logo depois da incubação as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com T-TBS e 1 vez por 10 minutos com TBS (do inglês – Tris Buffered Saline – NaCl a 500 mM; TRIS a 30 mM; água Milli-Q®; pH 7,5).

A detecção das bandas foi feita utilizando uma solução comercial de ECL (do inglês – Enhanced chemiluminescens) (ThermoFisher) na proporção de 1:1 entre as soluções “A” e “B” (solução de uso). A solução preparada foi vertida sobre cada membrana, espalhada e aguardado o tempo de 1 minuto. As imagens de quimiolumescência foram obtidas através do software ImageQuant® LAS 4000 CCD Camera System (GE Healthcare) e a quantificação da intensidade dos pixels foi feita através do software ImageJ (Image processing and analysis in Java – NIH).

3.11 CONTEÚDO DE β A

O conteúdo de β A foi avaliado no hipocampo e LCR por meio do Kit comercial Rat β A₄₂ ELISA Kit (Elabscience) conforme descrito na bula do kit.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6.0. Para as análises comportamentais e bioquímicas foi

utilizado o teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão.

CAPÍTULO II

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO COGNITIVA

Observamos déficit cognitivo em curto (1h) e longo prazo (24h) em todos os tempos (2, 4, 8 e 16 semanas) analisados pós indução do modelo (figuras 2A e B). Os dados são expressos em porcentagem de exploração do novo objeto pelo animal, sendo considerado que os animais do grupo *SHAM* realizaram uma maior exploração do objeto novo e os animais do grupo *STZ* exploraram igualmente ($\leq 50\%$) os objetos para eles apresentados.

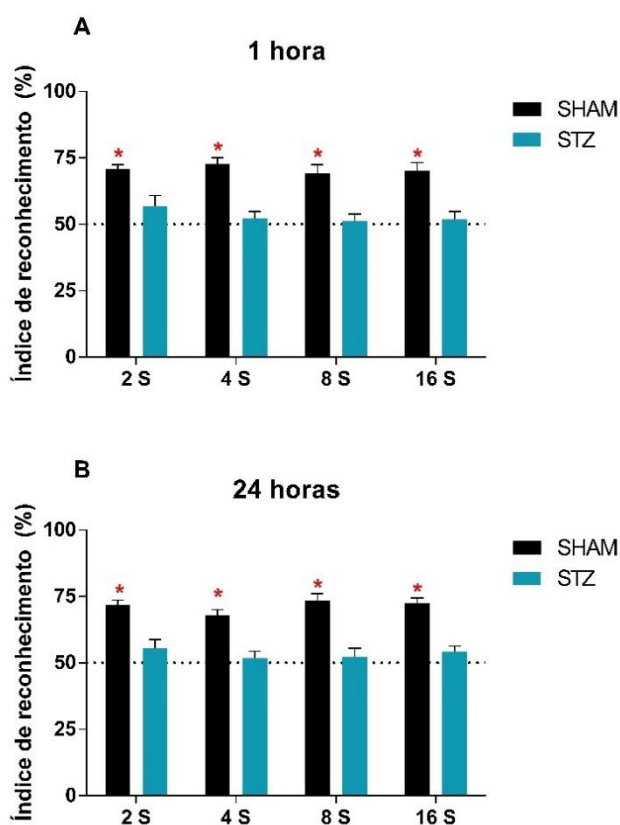


Figura 2: Desempenho cognitivo dos ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ (3 mg/kg). Os animais foram avaliados pelo teste de reconhecimento de objetos 2, 4, 8 e 16 semanas após a indução do modelo. A) Índice de reconhecimento da performance cognitiva dos animais 1 hora após o treino e B) Índice de reconhecimento da performance cognitiva dos animais 24 horas após treino. Os dados são apresentados como média (n = 12-14, teste t de Student, $p < 0,05$). A linha pontilhada representa 50%. * Porcentagem de exploração $\leq 50\%$.

4.2 CONTEÚDO DE β A

4.2.1 LCR

Não observamos nenhuma alteração significativa no conteúdo de β A₄₂ no LCR nos tempos de 2, 4 e 16 semanas (figura 3A, B e D) pós a injeção ICV-STZ. Observamos uma redução significativa de seu conteúdo apenas no tempo de 8 semanas (figura 3C) pós indução do modelo.

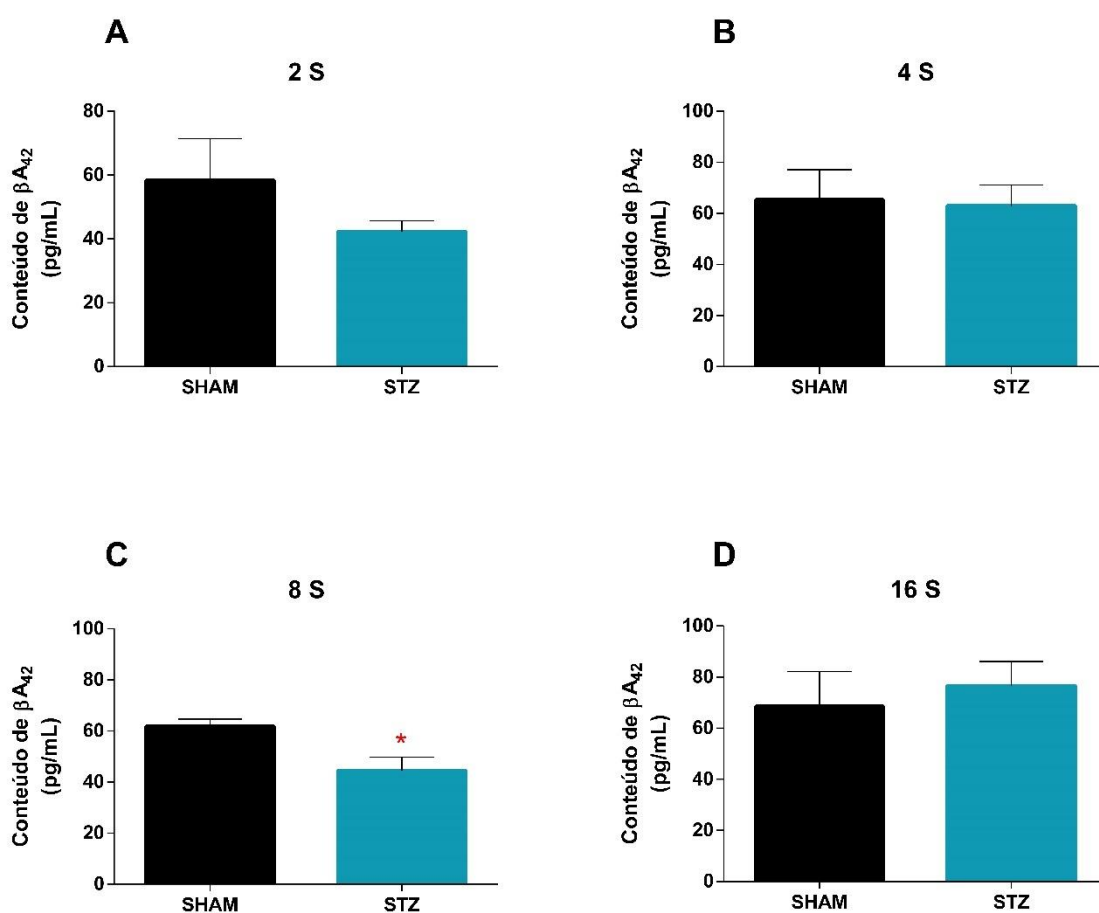


Figura 3: Conteúdo de β A₄₂ no LCR de ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ (3 mg/kg). Avaliação realizada pós indução do modelo nos tempos de: A) 2 semanas, B) 4 semanas, C) 8 semanas e D) 16 semanas através do kit comercial Rat A β ₄₂ ELISA Kit (Elabscience). Os dados estão expressos pela média \pm erro ($n = 5 - 7$, teste t de Student, $p < 0,05$). * Diferença significativa entre o grupo SHAM e STZ no tempo relacionado.

4.2.2 Hipocampo

Não observamos nenhuma alteração significativa do conteúdo de βA_{42} no hipocampo nos tempos de 2, 4 e 8 semanas (figura 4A e C) pós a injeção ICV-STZ. Apenas no tempo de 16 semanas (figura 4B) pós indução do modelo evidenciamos um aumento significativo de seu conteúdo.

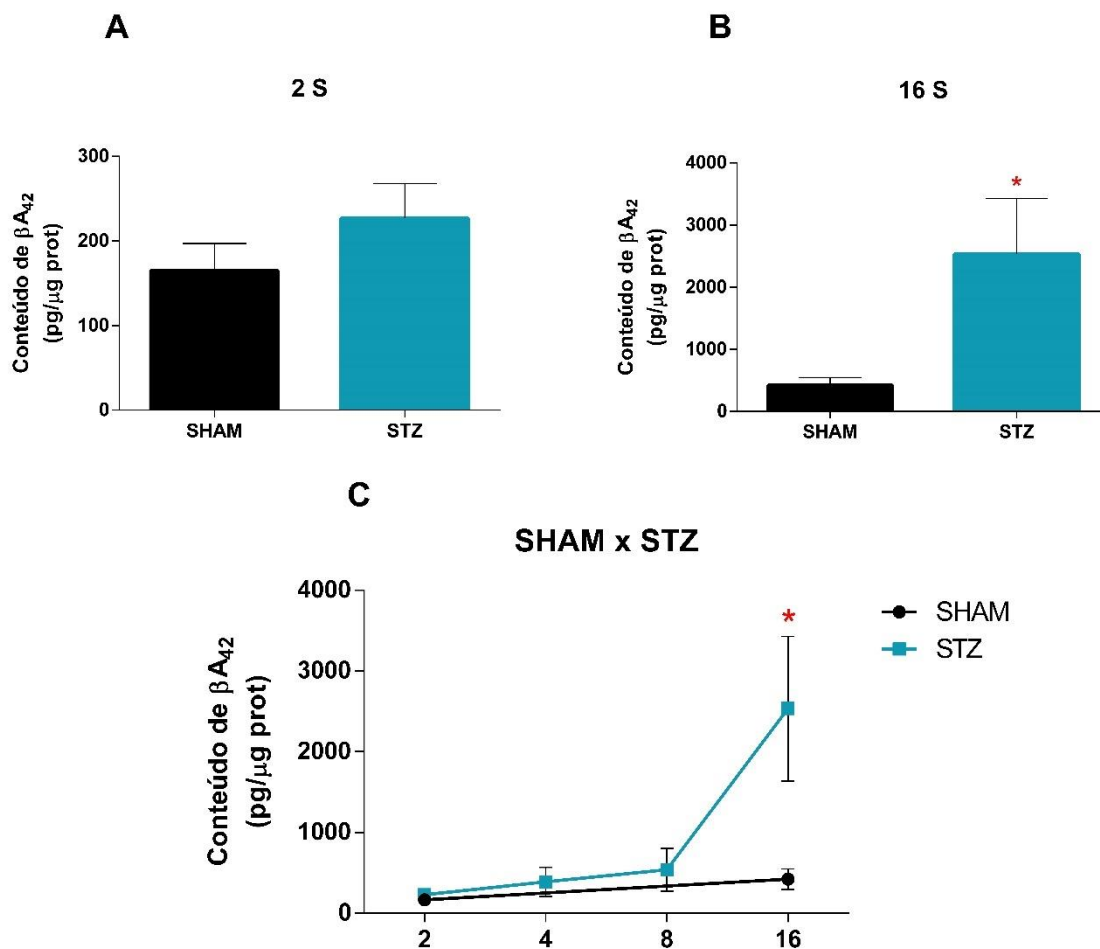


Figura 4: Conteúdo de βA_{42} no hipocampo de ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ (3 mg/kg). Avaliação realizada pós indução do modelo nos tempos de: A) 2 semanas, B) 16 semanas e C) 2, 4, 8, 16 semanas (representativo) através do kit comercial Rat $A\beta_{42}$ ELISA Kit (Elabscience). Os dados estão expressos pela média \pm erro ($n = 5 - 7$, teste t de Student, $p < 0,05$). * Diferença significativa entre o grupo SHAM e STZ no tempo relacionado.

4.3 CONTEÚDO DE NEP

Não constatamos nenhuma alteração significativa do conteúdo de NEP no hipocampo em 2 e 4 semanas (figuras 5A e B) pós a injeção ICV-STZ. Observamos significativamente um aumento de seu conteúdo em 8 semanas (figura 5C) e uma diminuição em 16 semanas (figura 5D) pós indução do modelo.

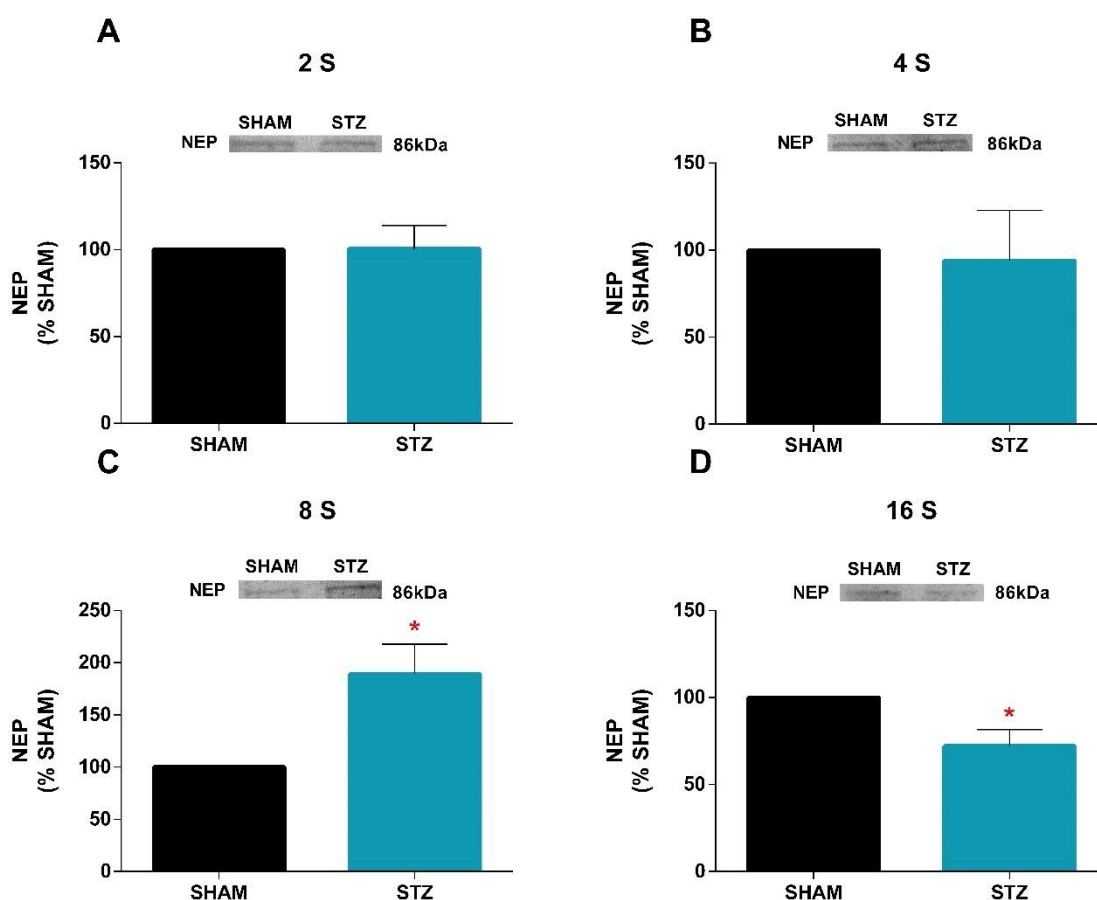


Figura 5: Conteúdo de NEP no hipocampo de ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ (3 mg/kg). Avaliação realizada pós indução do modelo nos tempos de: A) 2 semanas, B) 4 semanas, C) 8 semanas e D) 16 semanas através *western blotting* e normalizado pelo total de proteínas aplicada no gel durante eletroforese (20 µg), assumindo o grupo *SHAM* como 100%. Os dados estão expressos pela média ± erro (n = 6 - 8, teste t de Student, p < 0,05). *Diferença significativa entre o grupo *SHAM* e *STZ* no tempo relacionado.

4.4 CONTEÚDO DE IDE

Não observamos nenhuma alteração significativa no hipocampo do conteúdo de IDE nos tempos de 2, 4, 8 e 16 semanas (figuras 6A, B, C e E) pós a injeção ICV-STZ.

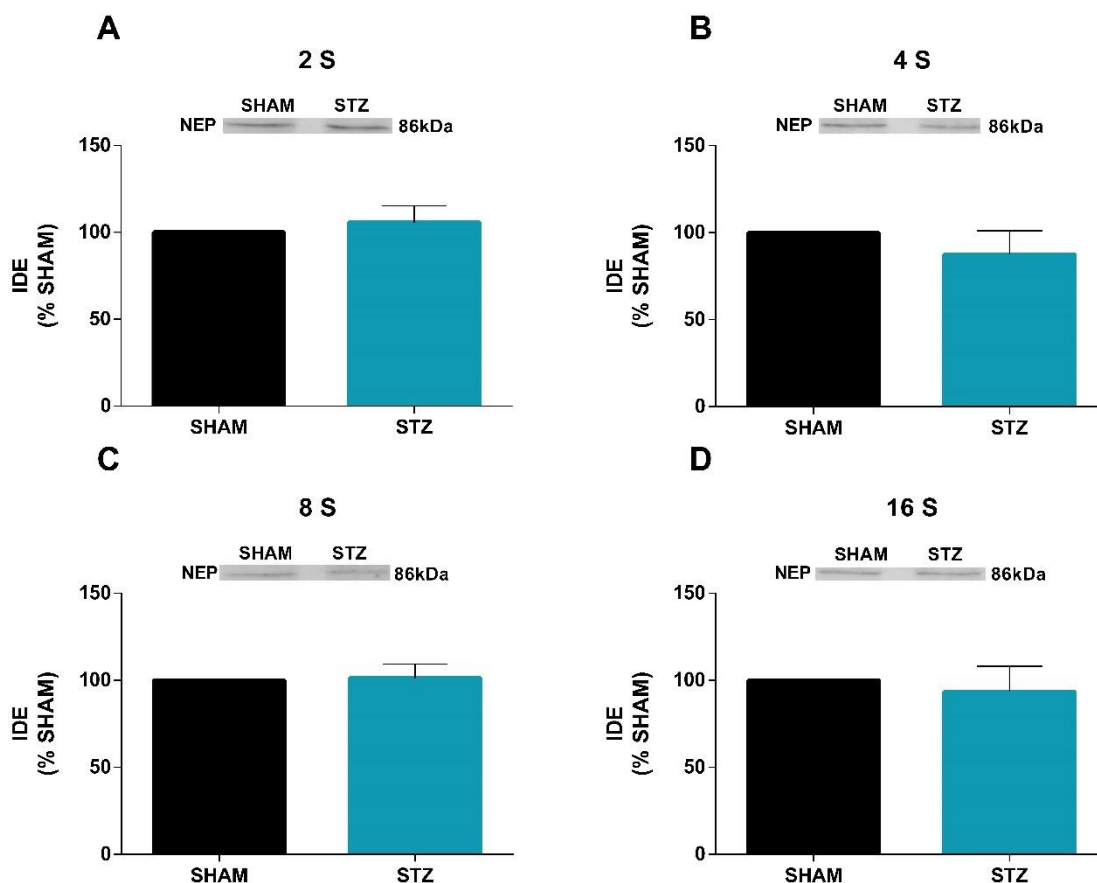


Figura 5: Conteúdo de IDE no hipocampo de ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ (3 mg/kg). Avaliação realizada pós indução do modelo nos tempos de: A) 2 semanas, B) 4 semanas, C) 8 semanas e D) 16 semanas através *western blotting* e normalizado pelo total de proteínas aplicada no gel durante eletroforese (20 μ g), assumindo o grupo *SHAM* como 100%. Os dados estão expressos pela média \pm erro ($n = 6 - 8$, teste t de Student, $p < 0,05$). *Diferença significativa entre o grupo *SHAM* e STZ no tempo relacionado.

PARTE III

5 DISCUSSÃO

A DA é responsável pelo maior número de casos de demência no mundo, sendo a DA do tipo esporádica a forma mais comum da doença (BIASIBETTI et al., 2017; NAGATA et al., 2018). Neste contexto, o modelo animal gerado pela administração ICV-STZ tem sido utilizado para estudar a DA esporádica (CHEN et al., 2013). Este modelo mimetiza diversas características comportamentais, neuroquímicas e estruturais da DA. Apresenta evidências de deposição de β -amiloide, da patologia da tau, neuroinflamação e revela prejuízo na memória nos testes comportamentais. (NARDIN et al., 2016; NAZEM et al., 2015; SORIAL; EL SAYED, 2017).

Neste trabalho utilizamos o modelo animal de ICV-STZ para estudar a DA do tipo esporádica. Avaliamos o déficit cognitivo, o conteúdo de β A e das enzimas responsáveis por sua depuração, NEP e IDE nos tempos de 2, 4, 8 e 16 semanas após o procedimento de indução do modelo. Para avaliar a memória do animal foi utilizado o teste comportamental de reconhecimento de objetos, que se baseia no comportamento inato de um roedor de explorar mais o objeto que ele ainda não conhece do que um objeto familiar (BIASIBETTI et al., 2017).

Em todos os tempos, 2, 4, 8 e 16 semanas, observamos um declínio cognitivo significativo nos animais do grupo STZ quando comparados com o grupo *SHAM*. Este resultado está de acordo com outros trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, onde os animais também apresentaram déficit cognitivo (BIASIBETTI et al., 2017; VICENTE et al., 2009).

Este resultado também corrobora com outros trabalhos onde foi observado declínio cognitivo neste modelo em 2, 3 e 15 semanas após o procedimento ICV-STZ

(RAVELLI et al., 2017; SAMY et al., 2016). Uma das justificativas encontradas para este achado seria que o comprometimento da memória estaria associado com a deposição do peptídeo β A nestes animais (SHALABY; NOUNOU; DEIF, 2019). No entanto, esta justificativa não está correlacionada com nosso próximo resultado.

O conteúdo de β A₄₂ no hipocampo também foi analisado neste projeto. Não houve resultado significativo do seu conteúdo em 2, 4 e 8 semanas, apenas em 16 semanas observamos um aumento significativo. Desta maneira, supomos que o déficit cognitivo observado no teste comportamental não esteja relacionado com o acúmulo de β A₄₂ no hipocampo, sendo outro mecanismo responsável por este prejuízo na memória.

A administração de ICV-STZ leva a diminuição da captação de glicose no cérebro através da dessensibilização dos receptores de insulina cerebral, (GRIEB, 2016). Desta forma, ocorre um desequilíbrio metabólico e estresse oxidativo que pode desencadear apoptose, reatividade astrocitária e secreção de mediadores pró-inflamatórios desencadeando um processo neuroinflamatório e dano neuronal, o que pode levar a um prejuízo cognitivo (KAMAT, 2015; NAZEM et al., 2015). Nazem e colaboradores evidenciam que no modelo de ICV-STZ a neuroinflamação precede o acúmulo de β A e a hiperfosforilação da tau (NAZEM et al., 2015). Outro trabalho revela uma precoce e extensiva neuroinflamação neste modelo, caracterizada pelo aumento da reatividade astrogliar principalmente no hipocampo (CHEN et al., 2013).

Neste trabalho tínhamos como objetivo avaliar o conteúdo de GFAP e S100B, ambas proteínas marcadoras de reatividade astrogliar, no entanto não foi possível concluir este objetivo por limitações decorrentes no atraso da importação de anticorpos. Entretanto, outro trabalho do grupo de pesquisa avaliou o conteúdo destas

proteínas nos tempos de 2, 4 e 8 semanas após a ICV-STZ. O conteúdo de S100B teve um aumento no tempo de 8 semanas, já o conteúdo de GFAP teve um aumento nos 3 tempos analisados, o que seria indicativo de reatividade astrocitária em função da neuroinflamação (BIASIBETTI et al., 2017).

Em 1 semana após administração de ICV-STZ, Kraska e colaboradores encontraram alterações neuroinflamatórias (KRASKA et al., 2012). Em 2 semanas após indução do modelo há relatos de declínio cognitivo em testes comportamentais (BIASIBETTI et al., 2017; RAVELLI et al., 2017). Enquanto evidências de β A são encontradas em torno de 12 semanas após a ICV-STZ. (NAZEM et al., 2015; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2011). Esses relatos corroboram com nossos resultados e sugerem que a neuroinflamação possa desencadear o déficit cognitivo observado no teste comportamental.

Outro resultado que obtivemos, relacionado aos níveis de β A, foi o conteúdo de NEP no hipocampo. Em 2 e 4 semanas pós indução do modelo não houve diferenças significativas entre o grupo *SHAM* e STZ. Já no tempo de 8 semanas observamos um aumento significativo de seu conteúdo, seguido por uma queda também significativa em 16 semanas. Dentre as enzimas capazes de degradar o β A, a NEP parece ser a mais relevante para o controle dos seus níveis no SNC (MARR; HAFEZ, 2014).

Supomos que este aumento de NEP em 8 semanas, antes de sua queda no próximo tempo analisado, seja uma tentativa de conter o aumento de β A₄₂ evidenciado no hipocampo em 16 semanas. Yon e Jo discutem que em determinados casos enzimas capazes de degradar o β A, como NEP, possam ter seus níveis aumentados em resposta à sua toxicidade devido a um mecanismo compensatório do corpo

(YOON; JO, 2012). Corrobora com esta hipótese um trabalho onde camundongos transgênicos para DA foram injetados com βA_{42} intracraniano e foi observado um aumento dos níveis de NEP, o que preveniu a formação da placa βA (MOHAJERI; WOLLMER; NITSCH, 2002).

Também avaliamos o conteúdo de βA_{42} no LCR neste trabalho. Nos tempos de 2 e 4 e 16 semanas pós indução do modelo não houve diferença significativa de βA_{42} , apenas no tempo de 8 semanas houve uma redução significativa de seu conteúdo. O βA pode ser eliminado do cérebro por outras vias além da degradação proteolítica (WANG et al., 2017). Existem evidências que sugerem que de 10 - 15% do conteúdo de βA pode ser drenado para o LCR a partir do líquido intersticial cerebral e seguir para a circulação sanguínea (TANZI; MOIR; WAGNER, 2004; YOON; JO, 2012).

Em 8 semanas, observamos um aumento do conteúdo NEP no hipocampo e uma redução no conteúdo de βA_{42} no LCR. Tem sido relatado em alguns trabalhos que uma superexpressão de NEP em modelos de camundongos transgênicos para DA pode reduzir significativamente os níveis de βA (LEISSRING et al., 2003; MARR et al., 2003; MOURI et al., 2006). Outro estudo sugere que uma deficiência nos níveis de NEP poderia elevar a eliminação de βA por outras vias em resposta a sua redução (FARRIS et al., 2007).

Embora o βA drenado para o LCR advenha de diversas estruturas do SNC além do hipocampo (SEPULCRE et al., 2013; YOON; JO, 2012) e com base nas informações acima, consideramos que nossos resultados talvez estejam relacionados, pois um aumento do conteúdo de NEP no hipocampo talvez possa diminuir a eliminação de βA por outras vias, resultando em sua redução no LCR.

Em nosso trabalho observamos no hipocampo que em 16 semanas o conteúdo de NEP diminuiu e o de βA_{42} aumentou significativamente. Estes resultados também têm sido evidenciados em outros trabalhos. Yin e colegas também observaram estes achados em um modelo esporádico da DA em ratos Sprague-Dawley induzidos por ICV-STZ (YIN et al., 2016). Huttenrauch e colegas avaliaram os níveis de βA em ratos transgênicos da DA e em ratos transgênicos da DA *NEP-knock-out* e observaram que os níveis de βA_{42} encontraram-se mais elevados no segundo modelo (HÜTTENRAUCH et al., 2015). Em amostras cerebrais *post mortem* de pacientes com DA também é encontrado um acúmulo de βA e uma diminuição do conteúdo de NEP (HELLSTRÖM-LINDAHL; RAVID; NORDBERG, 2008).

Como já mencionado, o conteúdo hipocampal de NEP teve um aumento em 8 semanas após indução do modelo, seguido por uma queda em 16 semanas e um aumento significativo no conteúdo de βA_{42} no hipocampo no mesmo período. Wang e colegas sugerem que o βA poderia levar uma indução patológica e modificações oxidativas na NEP e que isto poderia alterar seus níveis e atividade catalítica (WANG et al., 2010). Esta afirmação está de acordo com outro trabalho onde a atividade catalítica na NEP foi reduzida, levando a um aumento dos seus níveis de mRNA e conteúdo proteico após administração de βA de maneira aguda em cultura celular (WANG et al., 2009).

Como consequência, modificações oxidativas da NEP poderiam elevar seu aumento em um primeiro momento, como um mecanismo compensatório (WANG et al., 2010). No entanto, este aumento seria insuficiente para eliminar o excesso de βA o que resultaria na sua deposição e formação de placas. Este acúmulo de βA estimula um ambiente pró-oxidante o que torna a NEP mais suscetível a sofrer modificações

oxidativas que afetam sua atividade podendo acarretar uma diminuição de seu conteúdo em estágios mais avançados da patologia da DA (FARRIS et al., 2007; WANG et al., 2010).

Outra protease, a IDE, que tem como alvo o β A também foi avaliada no hipocampo. Não observamos resultado significativo em nenhum dos tempos analisados (2, 4, 8 e 16 semanas) pós indução do modelo. Dentre as proteases capazes de degradar o β A, NEP e IDE são consideradas as mais importantes (KUROCHKIN; GUARNERA; BEREZOVSKY, 2018).

Entretanto alguns trabalhos têm demonstrado diferentes resultados em relação ao conteúdo de IDE. Alguns estudos que utilizaram tecido cerebral humano de pacientes com DA encontraram níveis de IDE reduzidos no hipocampo (COOK et al., 2003; ZHAO et al., 2007). Já Wang e colegas não encontraram alterações significativas no conteúdo de IDE no cérebro de pacientes com DA, embora houvesse uma tendência no aumento de seus níveis. (WANG et al., 2010).

Osmanovic Barilar e colaboradores utilizaram o modelo de DA esporádica de ICV-STZ em ratos Wistar e observaram o conteúdo de IDE diminuído em 4, 12, 24 semanas após indução do modelo, achado que não está de acordo com nossos resultados (OSMANOVIC BARILAR et al., 2015). Já outro trabalho que também utilizou o modelo de ICV-STZ em ratos Sprague-Dawley não encontrou alterações significativas no conteúdo de IDE, no entanto o conteúdo de NEP estava diminuído e o de β A₄₂ aumentado significativamente (YIN et al., 2016).

Embora sejam encontrados trabalhos na literatura que sugerem a IDE como uma das principais enzimas responsáveis pela depuração do β A, não evidenciamos uma relação dela com o β A₄₂ nos nossos resultados. Além do mais, também é

encontrado divergências em seu conteúdo em vários trabalhos (COOK et al., 2003; WANG et al., 2010; ZHAO et al., 2007).

Wang e seus colegas sustentam a hipótese que a IDE talvez tenha um aumento de seus níveis em resposta a altos níveis de βA , sugerindo que ela poderia atuar como uma segunda linha de defesa contra sua deposição, quando os níveis de NEP estivessem diminuídos (WANG et al., 2010). Entretanto esta relação ainda é controversa e são para esclarecer o papel da IDE e sua relação com o βA na DA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, supomos que o déficit cognitivo observado no modelo de DA esporádica induzido por administração ICV-STZ seja devido à neuroinflamação desencadeada neste modelo. Isto está de acordo com a hipótese de que um dano inflamatório glial precede a cascata amiloide. Também presumimos que o conteúdo de NEP está relacionado com os níveis de β A, primeiramente indicando uma tentativa de conter o seu aumento e em período mais avançado patologicamente no modelo observamos sua diminuição seguido por um aumento de β A. Não observamos correlações entre o conteúdo de IDE e β A neste trabalho e o papel desta enzima precisa ser melhor esclarecido. Estes achados corroboram com relatos de que a NEP seria a principal protease envolvida na degradação do β A. Entretanto são necessários mais estudos acerca das proteínas (proteases e transportadores) envolvidas na depuração do β A.

REFERÊNCIAS

- BALSINHA, C. et al. Health-Care Delivery for Older People with Dementia in Primary Care. **Primary Care Mental Health in Older People**, p. 311–329, 2019.
- BARANELLO, R. et al. Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 12, n. 1, p. 32–46, 2015.
- BAYES-GENIS, A.; BARALLAT, J.; RICHARDS, A. M. A Test in Context: Neprilysin: Function, Inhibition, and Biomarker. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 6, p. 639–653, 2016.
- BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 281–296, 2009.
- 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, 2017.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 368, n. 9533, p. 387–403, 2006.
- BRENNER, M. Role of GFAP in CNS injuries. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 7–13, 2014.
- CHAVES, M. L. et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 1–7, 2010.
- CHEN, Y. et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). **Molecular neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 711–725, 2013.
- COOK, D. G. et al. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-ε4 allele. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 1, p. 313–319, 2003.
- DELIKKAYA, B. et al. Altered expression of insulin-degrading enzyme and regulator of calcineurin in the rat intracerebral streptozotocin model and human apolipoprotein E-ε4-associated Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring**, v. 11, p. 392–404, 2019.
- DETURE, M. A.; DICKSON, D. W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 1–18, 2019.
- DORSZEWSKA, J. et al. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 9, p. 952–963, 2016.
- DOS SANTOS, J. P. A. et al. Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 61, n. 1, p. 237–249, 2018.

- DOS SANTOS PICANCO, L. C. et al. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 26, p. 3141–3159, 2016.
- DUYCKAERTS, C.; DELATOUR, B.; POTIER, M. C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. **Acta Neuropathologica**, v. 118, n. 1, p. 5–36, 2009.
- FARRIS, W. et al. Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. **American Journal of Pathology**, v. 171, n. 1, p. 241–251, 2007.
- GABBOUJ, S. et al. Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain-special emphasis on pi3k-akt pathway. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JUN, p. 1–8, 2019.
- GÖTZ, J.; ITTNER, L. M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 532–544, 2008.
- GRIEB, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1741–1752, 2016.
- GRIMM, M. O. W. et al. Neprilysin and A β clearance: Impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, n. DEC, p. 1–27, 2013.
- GULOKSUZ, S. A. et al. Elevated plasma concentrations of S100 calcium-binding protein B and tumor necrosis factor alpha in children with autism spectrum disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 39, n. 3, p. 195–200, 2017.
- HELLSTRÖM-LINDAHL, E.; RAVID, R.; NORDBERG, A. Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: Inverse correlation with A β levels. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 2, p. 210–221, 2008.
- HENEKA, M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.
- HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358–372, 2015.
- HOL, E. M. et al. Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. **Molecular Psychiatry**, v. 8, n. 9, p. 786–796, 2003.
- HUNG, C. W. et al. Ageing and neurodegenerative diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. SUPPL., p. S36–S46, 2010.
- HÜTTENRAUCH, M. et al. Neprilysin deficiency alters the Neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 44, n. 4, p. 1291–1302, 2015.
- IRAM, T.; FRENKEL, D. Targeting the Role of Astrocytes in the Progression of Alzheimers Disease. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 7, n. 1, p. 20–27, 2012.

- ISHIKI, A. et al. Glial fibrillar acidic protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and frontotemporal lobar degeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 2, p. 258–261, 2016.
- KAMAT, P. K. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. **Neural Regeneration Research**, v. 10, n. 7, p. 1050–1052, 2015.
- KAMPHUIS, W. et al. Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 3, p. 492–510, 2014.
- KRASKA, A. et al. In Vivo Cross-sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012.
- KUROCHKIN, I. V.; GUARNERA, E.; BEREZOVSKY, I. N. Insulin-Degrading Enzyme in the Fight against Alzheimer's Disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 49–58, 2018.
- LAURENT, C.; BUÉE, L.; BLUM, D. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? **Biomedical Journal**, v. 41, n. 1, p. 21–33, 2018.
- LEISSRING, M. A. et al. Enhanced proteolysis of β -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. **Neuron**, v. 40, n. 6, p. 1087–1093, 2003.
- MARR, R. A. et al. Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 6, p. 1992–1996, 2003.
- MARR, R.; HAFEZ, D. Amyloid beta and Alzheimer's Disease: The role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. JUL, p. 1–7, 2014.
- MCKEON, A.; BENARROCH, E. E. Glial fibrillary acid protein: Functions and involvement in disease. **Neurology**, v. 90, n. 20, p. 925–930, 2018.
- MOHAJERI, M. H.; WOLLMER, M. A.; NITSCH, R. M. A β 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35460–35465, 2002.
- MOURI, A. et al. Inhibition of neprilysin by thiorphan (i.c.v.) causes an accumulation of amyloid β and impairment of learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 168, n. 1, p. 83–91, 2006.
- MU, Y.; GAGE, F. H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 85, 2011.
- NAGATA, K. et al. DNA methylation level of the neprilysin promoter in Alzheimer's disease brains. **Neuroscience Letters**, v. 670, p. 8–13, 2018.
- NARDIN, P. et al. Peripheral Levels of AGEs and Astrocyte Alterations in the Hippocampus of STZ-Diabetic Rats. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 8, p. 2006–2016, 2016.
- NAZEM, A. et al. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2015.

- OSMANOVIC BARILAR, J. et al. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 4, p. 565–576, 2015.
- PHILLIPS, E. C. et al. Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 5, p. 1321–1325, 2014.
- RAVELLI, K. G. et al. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 31, n. 3, p. 327–333, 2017.
- REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014.
- RIES, M.; SASTRE, M. Mechanisms of A β clearance and degradation by glial cells. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. JUN, p. 1–9, 2016.
- RODRÍGUEZ, J. J. et al. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 3, p. 378–385, 2009.
- SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 5, p. 765–772, 2011.
- SAMY, D. M. et al. Downstream modulation of extrinsic apoptotic pathway in streptozotocin-induced Alzheimer's dementia in rats: Erythropoietin versus curcumin. **European Journal of Pharmacology**, v. 770, p. 52–60, 2016.
- SEPULCRE, J. et al. In vivo characterization of the early states of the amyloid-beta network. **Brain**, v. 136, n. 7, p. 2239–2252, 2013.
- SHALABY, M. A.; NOUNOU, H. A.; DEIF, M. M. The potential value of capsaicin in modulating cognitive functions in a rat model of streptozotocin-induced Alzheimer's disease. **Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery**, v. 55, n. 1, 2019.
- SHIEH, J. C. C.; HUANG, P. T.; LIN, Y. F. Alzheimer's Disease and Diabetes: Insulin Signaling as the Bridge Linking Two Pathologies. **Molecular Neurobiology**, 2020.
- SIRACUSA, R.; FUSCO, R.; CUZZOCREA, S. Astrocytes: Role and functions in brain pathologies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. SEP, p. 1–10, 2019.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.
- SONG, E. S.; RODGERS, D. W.; HERSH, L. B. Insulin-degrading enzyme is not secreted from cultured cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 2018.
- SORIAL, M. E.; EL SAYED, N. S. E. D. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 6, p. 581–593, 2017.

TANZI, R. E.; MOIR, R. D.; WAGNER, S. L. Clearance of Alzheimer's A β peptide: The many roads to perdition. **Neuron**, v. 43, n. 5, p. 605–608, 2004.

TUNDO, G. R. et al. Insulin-degrading enzyme (IDE): A novel heat shock-like protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2281–2289, 2013.

UN DESA'S POPULATION DIVISION. **World Population Ageing 2019**. [s.l.: s.n.].

VALLES, S. L. et al. Function of glia in aging and the brain diseases. **International Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 11, p. 1473–1479, 2019.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of astroglia. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 239–389, 2018.

VETRIVEL, K. S.; THINAKARAN, G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 8, p. 860–867, 2010.

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

WANG, J. et al. A systemic view of Alzheimer disease - Insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 10, p. 612–623, 2017.

WANG, R. et al. Effects of HNE-modification induced by A β on neprilysin expression and activity in SH-SY5Y cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, n. 4, p. 1072–1082, 2009.

WANG, S. et al. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 1, p. 47–57, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Towards a dementia plan: a WHO guide**. [s.l.: s.n.].

WYSS-CORAY, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 180–186, 2016.

XIA, X. et al. Aging and Alzheimer's disease: Comparison and associations from molecular to system level. **Aging Cell**, v. 17, n. 5, p. 1–14, 2018.

YIN, C. et al. Icariside II, a novel phosphodiesterase-5 inhibitor, attenuates streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. **Neuroscience**, v. 328, p. 69–79, 2016.

YOON, S. S.; JO, S. A. Mechanisms of amyloid- β peptide clearance: Potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 245–255, 2012.

ZHANG, H. et al. Meta-analysis of expression and function of neprilysin in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 657, p. 69–76, 2017.

ZHAO, Z. et al. Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 28, n. 6, p. 824–830, 2007.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Desenho experimental	18
Figura 2: Desempenho cognitivo dos ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ	25
Figura 3: Conteúdo de βA_{42} no LCR de ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ.....	26
Figura 4: Conteúdo de βA_{42} no hipocampo de ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ	27
Figura 5: Conteúdo de IDE no hipocampo de ratos adultos submetidos à injeção ICV-STZ	29
Tabela 1: Organização dos grupos experimentais.....	18