

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ALTERAÇÕES NEUROGLIAIS EM RATOS EXPOSTOS AO ÁCIDO OCADÁICO
COMO MODELO DE DEMÊNCIA**

Ana Paula Costa

Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ALTERAÇÕES NEUROGLIAIS EM RATOS EXPOSTOS AO ÁCIDO OCADÁICO
COMO MODELO DE DEMÊNCIA**

Ana Paula Costa

Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

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

Porto Alegre

2011

Dedico esta dissertação aos meus pais e ao meu irmão,
pelo constante apoio, incentivo e compreensão.

"A beleza não está na chegada ou na partida, mas na travessia."

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Serei sempre muito grata ao CA. Pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal dentro do laboratório 33, pelo apoio e por sempre ser um exemplo, muito obrigada!

Agradeço a minha família, principalmente, aos meus pais e ao meu irmão, pelo amor incondicional em todos os momentos!

Muito obrigada professor Rodrigo Bainy Leal, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. E também aos amigos do laboratório de Neuroquímica 3. Mark, você é um grande amigo! Dé, muito obrigada por tudo! Vocês são essenciais na minha vida!

Obrigada amigas do meu coração, sempre presentes mesmo longe, Cassi, Carol, Gabi, Anne, Jade, Josi, Carol Hilgert, Suzane, Sílvia; e àquelas que vêm desde a infância, Dani e Cari, muito obrigada! Obrigada pela torcida amigo Denis! Cada um de vocês tem uma contribuição especial nessa conquista!

Amiga Fafá, agradeço muito a você e a sua família! Você fez parte de tudo isso, do começo ao fim! O carinho com que fui recebida e o apoio inicial de vocês fizeram toda a diferença nas minhas escolhas!

Obrigada professor Jorge Quillfeldt, e a todos do seu laboratório. Muito obrigada dona Zelma, Fabi, Lindsey, Ana, Josué. Aprendi muito com vocês!

Agradeço imensamente aos que fizeram parte deste trabalho! Ana Carolina, por ter me ensinado tudo dentro do laboratório 33, pela amizade e companheirismo de sempre! Nina, muito obrigada pela sua amizade, os ELISAS sem você nunca mais serão tão divertidos! Caren, obrigada pela amizade e disponibilidade para ajudar sempre! Cris, amiga de todos os momentos, muito obrigada por fazer parte da minha vida! Krista sentirei muita falta da sua amizade e da sua dedicação em tudo que faz! Lucas, obrigada por tudo, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas, científicas ou não; você é muito especial na minha vida! Sentirei muito falta de viver ao lado de vocês!

Muito obrigada pela convivência, Paulinha! Sentirei saudade de você!

Obrigada professora Marina! Sou muito grata por tudo que você me ensinou dentro do laboratório, te admiro muito! Muito obrigada professora Carmen, também sempre presente.

Agradeço aos amigos do laboratório 33, por todo o apoio nesse período, obrigada Lari, Pati, mamãe Dani, Maria Cristina, Jô, Caro, Paulo, Adri, Núbia, Fer, Elisa, Carol, Emerson, Márcio, Brisa, Maria da Graça. Obrigada pelo companheirismo e auxílio no laboratório! Obrigada à Lets, fundamental no meu trabalho, e que faz muita falta!

Pati Sesterheim tenho muito que agradecer pela sua dedicação ao trabalho que abraçou dentro da Bioquímica! Você é uma pessoa admirável!

Obrigada aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica.

Muito obrigada ao PPG Bioquímica, CAPES/CNPq e UFRGS pela oportunidade.

SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
INTRODUÇÃO	5
1. Demência.....	5
2. Modelo animal de demência por infusão de ácido ocadáico.....	6
3. Astrócitos	7
4. Proteína glial fibrilar ácida.....	9
5. S100B	10
6. Captação de glutamato	10
7. Glutamina sintetase	11
8. Captação de glicose.....	12
9. Estresse oxidativo.....	12
10. Glutathiona.....	13
11. Sinalização celular e a doença de Alzheimer	13
11.1 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	14
11.2 MAPKs e a doença de Alzheimer	14
OBJETIVOS	15
Objetivo geral.....	15
Objetivos específicos	15
PARTE II	16
CAPÍTULO I.....	17
Legends to the Figures:	45
PARTE III	55
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS.....	86

PARTE I

RESUMO

A demência é caracterizada como um declínio progressivo nas funções cognitivas e perda grave de memória. A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência. Dentre as características neuropatológicas, a doença caracteriza-se por perdas seletivas neuronais e sinápticas, presença de placas neuríticas extracelulares contendo o peptídeo β -amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares (NFTs) compostos de formas hiperfosforiladas da proteína tau. Diversos modelos animais têm sido desenvolvidos para investigar a etiologia da DA, embora ainda não estabelecida, muitos fatores de riscos e alterações patológicas tem sido utilizados para a elaboração de modelos *in vivo* e *in vitro* da DA. O ácido ocadáico (AO), um potente inibidor de fosfatase 1 e 2A, ocasiona a deposição de $A\beta$, perda neuronal e sináptica, e subsequente déficit de memória, características semelhantes às ocorridas na DA. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma possível disfunção cognitiva e alterações nos parâmetros bioquímicos astrocitários de ratos submetidos ao ácido ocadáico, intrahipocampal, como modelo de demência. Ratos Wistar machos (90 dias) foram submetidos à infusão intrahipocampal e bilateral de AO (100 ng), e 12 dias após a cirurgia, avaliada a memória pelo teste de memória espacial no labirinto aquático de Morris, e realizados testes bioquímicos. Usando este modelo animal de infusão do AO, nós observamos um déficit cognitivo espacial e alterações neurogliais, particularmente, em marcadores de astrogliose, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e S100B. Houve alterações no metabolismo do glutamato, pela diminuição significativa do transportador de aminoácido excitatório 2 (EAAT2/GLT-1) e atividade da glutamina sintetase; bem como, é característico na DA, um aumento no estresse oxidativo, observado pelo aumento das proteínas carboniladas e diminuição no conteúdo de glutathiona (glutathiona reduzida) no modelo de infusão do AO. Foram observadas também, alterações na via das MAPKs, onde a infusão do AO aumentou a fosforilação da p38^{MAPK}, não alterando outras MAPKs, como a JNK 1/2 e ERK 1/2. Em conclusão, a injeção bilateral de AO foi capaz de induzir um déficit cognitivo espacial e estresse oxidativo no modelo de demência proposto, e pela primeira vez ao nosso conhecimento, alterações astrogliais em modelo de demência induzido pelo AO. Por fim, as alterações astrogliais observadas neste modelo de demência contribuem para a compreensão da fisiopatologia da DA e de outras doenças acompanhadas de déficit cognitivo, bem como contribuem para a identificação de alvos terapêuticos para a DA.

ABSTRACT

Dementia is characterized as a progressive decline in cognitive functions and severe memory loss. Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. The defining neuropathological characteristics of AD are the presence of extracellular accumulation of aggregated β -amyloid in senile plaques in the brain, and also by intraneuronal aggregates of neurofibrillary (NFT) consisting of hyperphosphorylated tau proteins, which leads to progressive brain dysfunction. Although the cause of AD remains elusive, many possible risk factors and pathological alterations have been used in the elaboration of *in vivo* and *in vitro* models of this disease, including intrahippocampal infusion of okadaic acid (OA). Okadaic acid (OA), a potent inhibitor of phosphatase 1 and 2A, leads to the deposition of β -amyloid, subsequent neuronal degeneration, synaptic loss and memory impairments, all of which resemble AD-like pathology. In this study, our aim was to evaluate spatial cognitive deficit and neuroglial alterations in rats submitted to the OA-induced dementia model. Male Wistar rats (90 days old) were submitted to bilateral intrahippocampal OA-injection (100 ng), and 12 days after the surgery the rats were submitted to training and test in the Morris water maze, and biochemistry tests were performed. Using this model, we evaluated spatial cognitive deficit and neuroglial alterations, particularly astroglial protein markers such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100B. There have been changes in the metabolism of glutamate, the significant decrease in the excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2/GLT-1) and glutamine synthetase activity, as is characteristic of AD, increased oxidative stress, observed by increased protein carbonyl and decreased glutathione in rats submitted to injection of OA. Were also observed, alterations in the MAPKs pathway, where the infusion of OA increased the phosphorylation of p38^{MAPK}, without altering other MAPKs, such as JNK 1/2 and ERK 1/2. In conclusion, bilateral injection of OA induces spatial cognitive deficit, and causes oxidative stress in this model and demonstrates, for the first time to our knowledge, neuroglial alterations. Findings contribute to understanding diseases accompanied by cognitive deficit and the OA model of dementia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AO: ácido ocadáico

A β : peptídeo β -amilóide

DA: Doença de Alzheimer

EAAT1/GLAST: transportador de aminoácido excitatório 1

EAAT2/GLT-1: transportador de aminoácido excitatório 2

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

GS: glutamina sintetase

GSH: glutationa

LCR: líquido cefalorraquidiano

MAPK: proteínas cinases ativadas por mitógenos

NFTs: emaranhados neurofibrilares

PP1: proteína fosfatase 1

PP2A: proteína fosfatase 2A

RL: radicais livres

SNC: sistema nervoso central

INTRODUÇÃO

1. Demência

Demência é um problema grave e crescente de saúde pública que é patologicamente caracterizado por uma disfunção cortical e subcortical progressiva que resulta em um complexo declínio cognitivo, acompanhado por distúrbios de humor, comportamento e personalidade (Ritchie & Lovestone, 2002).

O termo demência abrange um conjunto de sintomas envolvendo principalmente falhas cognitivas, tais como, prejuízo de aprendizado e memória, podendo estar associada a uma série de enfermidades, em sua maioria, neurodegenerativas (Jellinger, 2006). Tais sintomas ocorrem de uma maneira mais pronunciada que aqueles observados como consequência do envelhecimento, quando todas as funções celulares, de um modo geral estão em declínio. A condição afeta cerca de 15% da população idosa de mais de 65 anos e 25% das pessoas acima de 80 anos, onde a doença de Alzheimer (DA) representa mais de 50% dos casos (Meeuwsen et al, 2009; Ritchie & Lovestone, 2002; Rodrigues et al, 2009).

A doença de Alzheimer tem como consequência representativa da sua sintomatologia a perda cognitiva progressiva e irreversível, com deficiência na capacidade dos indivíduos em formar novas memórias e lembrar acontecimentos recentes, entre outros distúrbios neuropsiquiátricos como alterações do humor e personalidade (Cummings et al, 1994; Selkoe, 2001). Dentre as características neuropatológicas, a doença caracteriza-se por perdas seletivas neuronais e sinápticas, presença de placas neuríticas extracelulares contendo o peptídeo β -amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares (NFTs) compostos de formas hiperfosforiladas da proteína tau (Delacourte & Defossez, 1986; Duyckaerts et al, 2009; J Lambert et al, 2008). Associado a estas características, ocorre uma série de eventos que levam à disfunção neuronal, especialmente de neurônios colinérgicos, em áreas relacionadas à cognição e à formação de memórias, como o córtex pré-frontal e o hipocampo, juntamente com as regiões associadas. Assim, cria-se um quadro de desequilíbrio neuroquímico onde co-existem sinais de neurodegeneração, neuroinflamação, estresse oxidativo, aumento da sinalização apoptótica, déficit colinérgico, excitotoxicidade glutamatérgica, disfunção mitocondrial e da homeostase do cálcio com prejuízo da transmissão sináptica e do equilíbrio entre diferentes neurotransmissores (Eikelenboom et al, 2006; McGeer et al, 1987; Selkoe, 2001).

2. Modelo animal de demência por infusão de ácido ocadáico

A doença de Alzheimer pode ser classificada em dois tipos: hereditária (tipo I), quando relacionada a diferentes genes como o da proteína precursora amilóide, da apolipoproteína E ou das prenilinas; e esporádica (tipo II), doença a qual todos os indivíduos estão sujeitos à medida que envelhecem. Esta última está associada ao estilo de vida e diversos fatores de risco, incluindo os distúrbios metabólicos, os quais têm sido associados com um aumento da incidência de DA esporádica e sua fisiopatogenia (Hoyer, 2002).

Há diversos modelos animais de demência, os quais são classificados como não-transgênicos, pois não envolvem a manipulação dos genes envolvidos diretamente com a DA, que visam mimetizar algumas características neuroquímicas e comportamentais da doença. Dentre eles, destacam-se a infusão intracerebroventricular (ICV) do peptídeo β -amilóide (Lopes et al, 2010), a destruição neurotóxica do núcleo basal magnocelular e suas eferências colinérgicas (Swarowsky et al, 2008), a oclusão permanente e bilateral das carótidas comuns, causando uma hipoperfusão cerebral crônica, evento também presente no estabelecimento da DA esporádica (Vicente et al, 2009); infusão ICV bilateral da toxina botulínica (tipo A) causando prejuízo na memória de referência (Lackovic et al, 2009) e o modelo de infusão do ácido ocadáico, nosso objeto de estudo, entre outros modelos.

O ácido ocadáico (AO, $C_{44}H_{44}O_{13}$), uma das principais toxinas marinhas associadas à diarreia em humanos causada pela ingestão de alguns tipos de moluscos - *diarrhetic shellfish poisoning* -, foi isolado pela primeira vez de uma esponja marinha, *Halichondria okadaei*, e posteriormente, demonstrado ser produzido por dinoflagelados marinhos do gênero *Dinophysis* (Dickey et al, 1990; Jayaraj et al, 2009). AO é um potente e seletivo inibidor de serina/treonina fosfatases 1 e 2A (Cohen et al, 1990; Ishihara et al, 1989), capaz de induzir hiperfosforilação da proteína tau (Arias et al, 1993; Ho et al, 1997; Mudher & Perry, 1998) e morte neuronal *in vitro* (Cagnoli et al, 1996) e *in vivo* (He et al, 2001).

O ácido ocadáico pode ter consequências metabólicas rápidas levando à morte celular pela alteração nas taxas de fosforilação-desfosforilação *in vivo* (Arias et al, 1998). Em culturas de neurônios corticais de ratos, AO pode induzir a morte celular por aumentar a fosforilação da proteína tau concomitantemente com alterações no citoesqueleto neuronal (Arias et al, 1993). AO pode também induzir dano e morte celular pela inativação por

fosforilação da Bcl-2 (Haldar et al, 1995), ativação de caspase 3 (Hong et al, 2002) ou formação de radicais livres (Matias et al, 1999) *in vitro*.

A infusão de ácido ocaídico em determinadas regiões do encéfalo, *in vivo*, pode acarretar uma patologia que se assemelha à DA, resultando em prejuízo na memória e alterações neuroquímicas importantes (Arendt et al, 1995; Arendt et al, 1998; He et al, 2001; Kamat et al, 2010; Tian et al, 2004; Zhao et al, 1995). Sendo o AO um potente e seletivo inibidor de proteínas fosfatases (PP1 e PP2A), sabendo de estudos prévios que a atividade dessas proteínas fosfatases é reduzida em cérebro de pacientes com DA (Gong et al, 1995; Gong et al, 1993), este modelo apresenta-se potencialmente relevante para o entendimento do desenvolvimento da DA em humanos.

3. Astrócitos

O sistema nervoso central (SNC) é constituído por dois grupos celulares, os neurônios e as células gliais (Jessen, 2004). Os neurônios foram por muito tempo considerados os elementos celulares responsáveis pelo processamento da informação, enquanto as células gliais eram reconhecidas apenas pelo seu papel de suporte. Porém, hoje se sabe que a glia possui um papel ativo e vital no SNC, não sendo apenas apoio metabólico para os neurônios (Perea & Araque, 2005; Volterra & Meldolesi, 2005). As células gliais são divididas em três categorias principais: (1) astrócitos e oligodendrócitos, ambos de origem ectodérmica, constituindo a macroglia; (2) a microglia, de origem mesodérmica; e (3) células ependimais, de origem ectodérmica (Perea & Araque, 2005; Young, 1991).

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC (Gee & Keller, 2005) e podem ser classificados em dois grupos: os astrócitos protoplasmáticos, que se localizam na substância cinzenta e são caracterizados por processos curtos e ramificados, e os astrócitos fibrosos, que estão presentes na substância branca e emitem longos processos em muitas direções (Gee & Keller, 2005; Kimelberg & Norenberg, 1989; Pereira & Furlan; Pereira & Furlan, 2010).

Devido a um crescente interesse nestas células, pesquisas demonstraram que os astrócitos são células multifuncionais, dentre as inúmeras funções exercidas pelos astrócitos pode-se citar:

- a) Direcionam e participam da formação das sinapses durante o desenvolvimento; produzem o refinamento das conexões sinápticas e promovem a sinaptogênese, através da síntese de proteínas da matriz extracelular, moléculas de adesão e fatores tróficos (Jessen, 2004; Ransom et al, 2003; Van Eldik & Wainwright, 2003; Wang & Bordey, 2008);
- b) Modulam a transmissão sináptica, exercendo papel no processamento de informações no cérebro (Allen & Barres, 2005);
- c) Participam da formação e manutenção da barreira hematoencefálica (Nedergaard et al, 2003; Wang & Bordey, 2008);
- d) Atuam como suporte energético pelo estoque de glicogênio, que quando necessário, pode ser degradado fornecendo lactato aos neurônios (Brown & Ransom, 2007; Pellerin & Magistretti, 2004);
- e) Tamponamento de íons extracelulares (Simard & Nedergaard, 2004);
- f) Captação de neurotransmissores na sinapse, como glutamato e GABA (Gee & Keller, 2005; Jessen, 2004);
- g) Síntese e liberação de GSH (Dringen et al, 2000; Shih et al, 2006);
- h) São essenciais no catabolismo e síntese de novos aminoácidos no cérebro (Maragakis & Rothstein, 2006);
- i) Atuação na resposta imune cerebral, respondendo a danos por meio de respostas inflamatórias (Gee & Keller, 2005).

Astrócitos podem fazer contato com sinapses de diferentes neurônios, e esta relação de proximidade levou ao termo de sinapse *tripartite* (Figura 1), que reconhece o astrócito como o terceiro elemento da sinapse (Araque et al, 1999; Perea & Araque, 2005). Além disso, os astrócitos expressam receptores para neurotransmissores, que ativam cascatas de sinalização, fazendo com que haja liberação de substâncias neuroativas pelos astrócitos, sinalizando de volta para o neurônio (Allen & Barres, 2009; Fellin & Carmignoto, 2004).

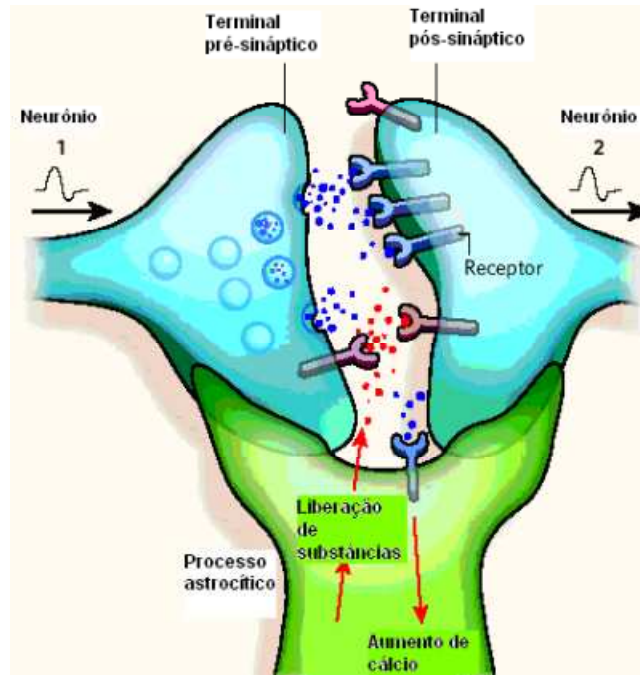


Figura 1 – Sinapse tripartite. Modificado de Allen & Barres, 2009.

4. Proteína glial fibrilar ácida

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é uma proteína de filamentos intermediários do tipo III do citoesqueleto glial (Gomes et al, 1999; Liem & Messing, 2009; Rodnight et al, 1997). Inicialmente isolada de lesões cerebrais de pacientes com esclerose múltipla, a GFAP, marcador específico de astrócitos, é considerada há décadas como um dos principais antígenos utilizados para a identificação e estudo do comportamento astrocítico (Eng et al, 2000).

A GFAP possui um peso molecular aparente de 50 kDa e, estruturalmente apresenta uma cabeça amino-terminal (altamente básica), e uma cauda carboxi-terminal (região responsável pela ligação entre os monômeros), ambas não-helicoidais, e uma porção central, composta por uma extensa α -hélice, cuja sequência de aminoácidos é conservada em relação a outros tipos de proteínas componentes dos filamentos intermediários (Eng et al, 2000).

A ativação glial em resposta à injúria envolve mudanças no conteúdo da GFAP, quando se apresenta aumentada no tecido, pode ser interpretado com um sinal de astrogliose associada a condições de injúria cerebral (Eng et al, 2000).

5. S100B

A proteína S100B faz parte da família de proteínas ligantes de cálcio S100 - solúvel em 100% de sulfato de amônio (Donato, 2001). A S100B é uma proteína do tipo EF-hand (hélice-*loop*-hélice), com peso molecular de 21 kDa. Estruturalmente, se apresenta como homodímeros constituídos por duas subunidades β ligadas por pontes dissulfeto, com dois sítios de ligação ao cálcio por monômero (Donato, 2003; Van Eldik & Wainwright, 2003).

A S100B é expressa e secretada principalmente por astrócitos (Donato, 2001; Zimmer & Van Eldik, 1987). No entanto, sua expressão já foi identificada em outros tipos celulares, como em oligodendrócitos em maturação e certas populações neurais (Donato et al, 2009). Além de possuir alvos intracelulares, a S100B exerce efeitos parácrinos, em neurônios e microglia, e autócrinos, em astrócitos (Donato et al, 2009; Ponath et al, 2007).

Em humanos, diversas condições patológicas e traumáticas investigadas têm demonstrado alterações da proteína S100B, especialmente no soro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes (Chaves et al, 2010; Van Eldik & Griffin, 1994).

6. Captação de glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC dos mamíferos (Meldrum, 2000). Uma vez liberado na sinapse, o glutamato não pode ser inativado por degradação, necessita ser removido do espaço extracelular por um eficaz sistema de transporte, de alta afinidade e dependente de Na^+ . Esse sistema de captação de glutamato para dentro das células é realizado por transportadores de membrana (EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1), localizados principalmente nos processos de astrócitos que envolvem as sinapses glutamatérgicas. Os quais contribuem para manter os níveis de glutamato extracelulares abaixo dos níveis tóxicos (Gegelashvili & Schousboe, 1998; Tsukada et al, 2005). Altas concentrações de glutamato extracelular levam à superestimulação neuronal, e subsequente morte celular por excitotoxicidade, situação geralmente envolvida em importantes desordens neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose amiotrófica lateral, e epilepsia (Danbolt, 2001).

A captação do glutamato extracelular pode estar afetada na DA (Fuller et al, 2010). Estudos evidenciam que essa excitotoxicidade pode ser resultado de uma diminuição ou perda da atividade, ou expressão, dos transportadores de glutamato, principalmente, devido à perda do transportador de aminoácido excitatório 2 (EAAT2/GLT-1), expresso majoritariamente em astrócitos (Gillissen et al, 2002; Li et al, 1997). Assim, relacionando os astrócitos, pode haver por parte desses uma perda na capacidade neuroprotetora de controle da concentração de glutamato extracelular, contribuindo para a lesão neuronal na DA.

7. Glutamina sintetase

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima presente em diversos órgãos como rins, fígado, músculo esquelético, baço, coração e encéfalo, a qual utiliza ATP para converter glutamato e amônia em glutamina, evento crucial no SNC (Fernandes et al, 2010; Walton & Dodd, 2007).

No cérebro, a GS é predominantemente expressa em astrócitos (Albrecht et al, 2007) e desempenha um papel fundamental na detoxificação da amônia do cérebro e na regulação dos níveis de glutamato (Suarez et al, 2002). Os astrócitos liberam glutamina para o espaço intersticial para a captação pelos neurônios, que posteriormente deaminam a glutamina através da glutaminase fosfato e, finalmente, a liberação do glutamato, que pode retornar aos astrócitos para completar o ciclo glutamina-glutamato (Hertz et al, 1999). Embora os neurônios normalmente expressem pouca, ou nenhuma GS (Norenberg, 1979), tem sido encontrado em neurônios piramidais no hipocampo e regiões do córtex temporal de pacientes na fase inicial da DA (Robinson, 2000). O padrão de atividade reduzido da GS na DA é consistente com outros estudos que evidenciam uma ruptura no metabolismo do glutamato, e há a hipótese de que esta redução pode acarretar um dano oxidativo (Smith et al, 1991). Por exemplo, a atividade de GS em homogeneizados de córtex de pacientes com DA é menor do que em homogeneizados do cérebro de indivíduos sem demência (Butterfield et al, 1997; Castegna et al, 2002).

8. Captação de glicose

Estudos recentes sugerem que os astrócitos podem metabolizar a glicose a lactato, e em seguida, transportá-lo para os neurônios (Pellerin, 2005). O glicogênio do cérebro, que é localizado predominantemente em astrócitos, pode servir como um depósito local de glicose para a mobilização, mais tarde, como um substrato energético neuronal (Lebed et al, 2008).

Sabe-se, de estudos prévios, que a captação de glicose no encéfalo de pacientes com DA está prejudicada (Freemantle et al, 2006) e, pelo menos em parte, este prejuízo é causado por uma redução na captação de glicose glial (Alexander et al, 2002).

9. Estresse oxidativo

Radicais livres (RL) consistem numa estrutura química com um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isso os torna muito instáveis, extremamente reativos e com uma enorme capacidade de se combinar inespecificamente a moléculas que fazem parte da estrutura celular (Halliwell, 2006b; Halliwell, 2007).

O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) inclui RL de oxigênio como os radicais superóxido e hidroxil, e também espécies que não são propriamente RL, mas derivadas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, que são capazes de gerar RL (Halliwell, 2007). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito os principais representantes (Halliwell & Whiteman, 2004). O estresse oxidativo se refere a uma alteração no equilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes, favorecendo a geração de moléculas pró-oxidantes, o que pode provocar danos a lipídios, proteínas e DNA (Halliwell, 2006a; Halliwell, 2007).

Embora os eventos iniciais da doença ainda sejam desconhecidos, o estresse oxidativo é um evento marcante durante a progressão de doenças neurodegenerativas crônicas, como a DA. Recentemente, tem sido enfatizado que o estresse oxidativo pode ser um dos responsáveis pela perda neuronal na DA, e que as espécies reativas de oxigênio estão intimamente relacionadas com a patogênese da doença (Smith et al, 2000; Tunez et al, 2003).

Este aumento no estresse oxidativo pode ser observado, também, em modelos celulares e animais da DA (Nunomura et al, 2006).

10. Glutathiona

Glutathiona (GSH), um tiol contendo um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos (Pope et al, 2008). Os astrócitos provêm um importante sistema antioxidante para o SNC através da produção e secreção de glutathiona (Dringen, 2000). Para a efetividade de tal papel antioxidante é necessário um equilíbrio entre as formas GSH e GSSG, bem como da quantidade sintetizada e do consumo e transporte para outras células (Hirrlinger & Dringen, 2010).

Na sua forma reduzida, GSH é o maior antioxidante do cérebro. Como antioxidante, são crescentes as evidências de que a GSH desempenha um papel importante na detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no SNC (Bains & Shaw, 1997). Comprometimento desse sistema antioxidante glial pode influenciar na sobrevivência neuronal de certas condições patológicas que envolvem danos oxidativos, como a DA. Há evidências que o conteúdo de glutathiona diminui com o envelhecimento (Cudkowicz et al, 1999) e que o fornecimento de GSH e de precursores de GSH aos neurônios estão afetados na DA (Calabrese et al, 2006).

11. Sinalização celular e a doença de Alzheimer

O estado de fosforilação de uma fosfoproteína é determinante para o equilíbrio entre a atividade de uma proteína cinase e uma proteína fosfatase que regula a sua fosforilação. Proteína tau é fosforilada em mais de 30 resíduos de serina/treonina na DA (Iqbal et al, 2005), e é substrato para várias proteínas cinases (Johnson & Hartigan, 1999; Singh et al, 1994). Entre elas, a glicogênio sintase-3 (GSK-3 β), proteína cinase ciclina dependente 5 (cdk5), a proteína cinase A (PKA), proteína cinase dependente de cálcio²⁺/calmodulina (CaMKII), e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), como a ERK 1/2 e as proteínas cinases

ativadas por estresse, p38^{MAPK} e JNK 1/2. As MAPKs têm sido fortemente implicadas na hiperfosforilação anormal da proteína tau (Pei et al, 2003).

O nível de fosforilação da proteína tau é regulado, também, por proteínas fosfatases (PPs). A atividade de PP2A regula a fosforilação da proteína tau em tecido cerebral, e esta, apresenta-se diminuída no cérebro de pacientes com DA (Gong et al, 1995; Gong et al, 1993).

11.1 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

As MAPKs são uma família de serina-treonina cinases, ativas por fosforilação, mediadoras de várias respostas celulares, como proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e morte (Kim & Choi, 2010). As três principais MAPKS identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2), cinase c-Jun N-terminal (JNK 1/2) e as p38^{MAPK} (Chang & Karin, 2001; Chen et al, 2001; Thomas & Haganir, 2004; Waetzig & Herdegen, 2004). Todas as vias operam em forma de cascata: uma MAP cinase cinase cinase (MAP3K) ativa, por fosforilação, uma MAP cinase cinase (MAP2K) que, por sua vez, fosforila e ativa a MAP cinase (MAPK).

11.2 MAPKs e a doença de Alzheimer

Proteínas cinases têm sido relacionadas com a hiperfosforilação anormal da proteína tau (Churcher, 2006). Em relação à DA, o aumento da atividade da p38^{MAPK} foi observado por Hesley e colaboradores (1999), onde cérebros *post-mortem* de pacientes com DA revelaram que o aumento da fosforilação de p38^{MAPK} está associado com placas neuríticas extracelulares contendo o peptídeo β -amilóide e emaranhados neurofibrilares (NFTs) compostos de formas hiperfosforiladas da proteína tau (Hensley et al, 1999). Vários estudos utilizando tecidos *post-mortem* e controle de casos confirmaram essa ativação de p38^{MAPK} ocorrendo em estágios iniciais da DA (Sun et al, 2003). A via de ativação de JNK pode ser de particular interesse, visto que, a fosforilação de JNK pode levar à apoptose e, portanto, ser a base da neurodegeneração relatada na DA (Vogel et al, 2009). A ativação de JNK é observada em modelos animais de DA (Savage et al, 2002) e em casos clínicos da DA (Zhu et al, 2001). Estudos prévios relatam a ativação de ERK 1/2 MEK ½ e p70 S6 cinase; e a hiperfosforilação da tau, induzida pela inibição de PP2A pelo ácido ocadáico (Pei et al, 2003).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar a ação do ácido ocadáico como modelo de demência, pela infusão intrahipocampal em ratos adultos, através de parâmetros comportamentais (performance cognitiva), neuroquímicos e imunoistoquímicos astrogliais.

Objetivos específicos

- Investigar a duração e possíveis variações na magnitude do déficit cognitivo, por tarefa de aprendizado no labirinto aquático de Morris;
- Verificar a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) por imunoistoquímica no hipocampo;
- Realizar a quantificação por ELISA das proteínas S100B (líquor e hipocampo) e GFAP (hipocampo);
- Verificar a captação de glutamato e atividade da glutamina sintetase no hipocampo;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo, como conteúdo de glutathiona (GSH) e quantidade de proteínas carboniladas no hipocampo;
- Verificar os possíveis efeitos do ácido ocadáico sobre as MAPKs no hipocampo.

PARTE II

CAPÍTULO I

NEUROGLIAL ALTERATIONS IN RATS SUBMITTED TO OKADAIC ACID- INDUCED MODEL OF DEMENTIA

Manuscrito aceito

Behavioural Brain Research

doi:10.1016/j.bbr.2011.09.035

**NEUROGLIAL ALTERATIONS IN RATS SUBMITTED TO THE OKADAIC ACID-
INDUCED MODEL OF DEMENTIA**

Ana Paula Costa ^a, Ana Carolina Tramontina ^a, Regina Biasibetti ^a, Cristiane Batassini ^a, Mark
William Lopes ^c, Krista Minéia Wartchow ^a, Caren Bernardi ^b, Lucas Silva Tortorelli ^a,
Rodrigo Bainy Leal ^c, Carlos Alberto Gonçalves ^a.

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa
Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

ABSTRACT

Several types of animal models have been developed to investigate Alzheimer's disease (AD). Okadaic acid (OA), a potent inhibitor of phosphatases 1 and 2A, induces characteristics that resemble AD-like pathology. Memory impairment induced by intra-hippocampal injection of OA has been reported, accompanied by remarkable neuropathological changes including hippocampal neurodegeneration, a paired helical filament-like phosphorylation of tau protein, and formation of β -amyloid containing plaque-like structures. Rats were submitted to bilateral intrahippocampal okadaic acid-injection (100 ng) and, 12 days after the surgery, behavioral and biochemical tests were performed. Using this model, we evaluated spatial cognitive deficit and neuroglial alterations, particularly astroglial protein markers such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100B, metabolism of glutamate, oxidative parameters and alterations in MAPKs. Our results indicate significant hippocampal changes, including increased GFAP, protein oxidation, and phosphorylation of p38^{MAPK}; and decreases in glutathione content, transporter EAAT2/GLT-1, and glutamine synthetase activity as well as a decrease in cerebrospinal fluid S100B. No alterations were observed in glutamate uptake activity and S100B content. In conclusion, the OA-induced model of dementia caused spatial cognitive deficit and oxidative stress in this model and, for the first time to our knowledge, specific astroglial alterations. Findings contribute to understanding diseases accompanied by cognitive deficits and the neural damage induced by AO administration.

1 INTRODUCTION

Dementia is characterized as a progressive decline in cognitive functions and severe memory loss (Alzheimer's Association, 2008; Weinstock & Shoham, 2004). Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia (Sennvik et al, 2000) and is an age-related neurodegenerative disorder resulting from a complex interaction between genetic and environmental factors (Trojanowski et al, 2010). The defining neuropathological characteristics of AD are the presence of the extracellular accumulation of aggregated amyloid in senile plaques in the brain, as well as intraneuronal aggregates of neurofibrillary tangles (NFT) consisting of hyperphosphorylated tau proteins, which leads to progressive brain dysfunction (Kosik et al, 1986; Silvestrelli et al, 2006).

Astrocytes are intimately associated with neurons and activated astrocytes are found in association with senile plaques (Halassa et al, 2007; Mrazek & Griffin, 2001). Glial activation in response to injury stimuli commonly involves changes in glial fibrillary acid protein (GFAP), S100B protein, glutamate metabolism and antioxidant defenses (Donato et al, 2009; Eng et al, 2000; Goncalves et al, 2008). In fact, astrocytes are key elements in the brain metabolism of glutamate, as they are responsible for removing glutamate from the synaptic cleft and for the synthesis of glutamine, which is sent back to the neuron to renew glutamate stocks (Nedergaard et al, 2002). Therefore, glutamate uptake and glutamine synthetase (GS) activities are also used to characterize astroglial function in brain tissue. Glutathione (GSH) is synthesized and secreted by astrocytes (Pope et al, 2008) and the most robust and significant alteration in the antioxidant defense is a decrease in GSH concentration (Schulz et al, 2000).

Several non-transgenic animal models have been proposed for studying the mechanism of AD, including chronic cerebral hypoperfusion (Vicente et al, 2009), intracerebroventricular (ICV) infusion of amyloid- β peptide (Craft et al, 2005), botulinum toxin type A (Lackovic et

al, 2009), or streptozotocin (Rodrigues et al, 2009), lesion of nucleus basalis magnocellularis (Swarowsky et al, 2008), and intracerebral infusion of okadaic acid (Arendt et al, 1998; He et al, 2001; Kamat et al, 2010).

Okadaic acid (OA), a selective and potent inhibitor of serine/threonine phosphatases 1 and 2A (Cohen et al, 1990; Ishihara et al, 1989), induces hyperphosphorylation of tau protein and neuronal cell death *in vitro* (Cagnoli et al, 1996) and *in vivo* (He et al, 2001). Previously, it has been shown that the activity of protein phosphatase-2A (PP2A) is decreased in the brains of AD patients (Zhou et al, 2008).

The hyperphosphorylation of tau critically impairs its binding capacity to microtubules and, therefore, is believed to disrupt the axonal cytoskeleton and retrograde transport, with a subsequent decline in cognition (Iqbal & Grundke-Iqbal, 1996). To understand the process that contributes to AD dementia, intensive research efforts are currently focused on the mechanisms that lead to the abnormal phosphorylation of tau. Protein kinases able to phosphorylate tau include extracellular-regulated kinase 2 (Braak & Braak, 1998), cdk5 with its activator protein 25 (Liu et al, 2002), and isoforms of glycogen synthase kinase-3 (Ishiguro et al, 1993). More recently, the stress-activated protein kinases (SAPKs) and p38^{MAPK}, both members of the MAPK family (Chang & Karin, 2001), have been added to the list. Many proteins have been identified as potential targets for treating AD, including p38^{MAPK} (Munoz & Ammit, 2010).

The mechanism involved in Alzheimer's disease is not completely understood and how glial cells contribute to this neurodegenerative disease remains to be elucidated. In this study, our aim was to evaluate spatial cognitive deficit and neuroglial alterations in rats submitted to the OA-induced dementia model, particularly with regard to astroglial protein markers (GFAP and S100B), glutathione content, protein oxidation, glutamate metabolism and alterations in

MAPKs. The working hypothesis is that OA injection provokes cognitive impairment and neuroglial alterations.

2 EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1 Chemicals

Okadaic acid was purchased from Calbiochem. Sodium carbonate, albumin, tween-20, γ -glutamylhydroxamate, o-phenylenediamine, and monoclonal anti-S100B antibody, anti-phospho-p38^{MAPK} antibody, anti-total- p38^{MAPK} antibody, anti-total-JNK 1/2 antibody, anti-total-ERK 1/2 antibody, were purchased from Sigma. L-[³H]-Glutamate was purchased from Amersham International (UK) and D-PBS from Gibco. Anti-S100 antibody conjugated with peroxidase and anti-GFAP antibody were purchased from Dako. Anti-phospho-JNK 1/2 antibody and anti-phospho-ERK 1/2 antibody were from Cell Signaling. The anti-rabbit antibody was purchased from Millipore. Anti- EAAT2/GLT-1 was purchased from ABCam. Anti- β -actin antibody and anti-mouse antibody were purchased from Santa Cruz. All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

2.2 Animals

Thirty male Wistar rats (90 days old, weighing 250-320 g) were obtained from our breeding colony (at the Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ$ C) with free access to food and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes 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 (N = 14) and okadaic acid (N = 16). After behavioral tasks, rats were anaesthetized, as subsequently described: (i) for CSF puncture, perfusion performed for immunohistochemistry (first set of measurements); or (ii) for brain preparation, aiming to evaluate S100B and GFAP content, glutamate uptake, glutamine synthetase, glutathione content, protein carbolys, glucose uptake, and Western blotting analysis (second set of measurements).

2.3 Surgical procedure

Okadaic acid (OA) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentration of 1 mM and diluted to an appropriate concentration in D-PBS (12% of DMSO). OA (100 ng) was intra-hippocampal infused. 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 hippocampus. The dorsal hippocampus was accessed using the following coordinates (Paxinos, 1997): AP 4.2 mm (from bregma), LL +3.0 mm, DV 1.8 mm, just 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus. Rats received a single bilateral infusion of 1 μ L de OA (100 ng) or vehicle (D-PBS containing 12% DSMO). A sterilized needle connected to a 5 μ L Hamilton syringe was sterotaxically placed near the CA1 area of the dorsal hippocampus. The rate of infusion was approximately 0.5 μ L/min and the needle was left in place for 3 min after the injection before being withdrawn. After the surgical procedure, rats were placed on a heating pad to maintain body temperature at 37.5 ± 5 °C and were kept there until recovery from anesthesia. It was not observed mortality in both groups, OA

infusion or sham group. The animals were submitted to behavioral tasks and biochemical analysis twelve days after the OA-injection.

2.4 Cognitive evaluation

Twelve days after surgery, rats were submitted to training in the Morris water maze (Morris, 1984). The apparatus consisted of a circular pool (180 cm diameter, 60 cm high) filled with water (depth 30 cm; 24 ± 1 °C), placed in a room with consistently located spatial cues. An escape platform (10 cm diameter) was placed in the middle of one of the quadrants, 1.5 cm below the water surface, equidistant from the sidewall and the middle of the pool. The platform provided the only escape from the water and was located in the same quadrant every trial. Four different starting positions were equally spaced around the perimeter of the pool. On each training day, all four start positions were used once in a random sequence, i.e., four training trials per day. A trial began by placing the animal in the water facing the wall of the pool at one of the starting points. If the animal failed to escape within 60 s it was gently conducted to the platform by the experimenter. The rat was allowed to stay there for 20 s. The inter-trial interval was 10 min. After each trial, the rats were dried, and returned to their cages at the end of the session. Animals were trained for 5 days. 24 h after the last training session, the rats were submitted to a test session. Before this session, the submerged platform was removed. The retention test consisted of placing the animals in the water for 1 min. The number of crossings over the original position of the platform and time spent in the target quadrant, compared to the opposite quadrant, were measured.

2.5 Cerebrospinal fluid and slices samples

Animals were anesthetized, as described above, and then positioned in a stereotaxic holder and cerebrospinal fluid (CSF) was obtained by cisterna magna puncture using an insulin syringe (27 gauge \times 1/2" length). CSF was frozen (-20 °C) until further analysis (Vicente et al, 2007). The animals were killed by decapitation, brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄ and 10 glucose, adjusted to pH 7.4 and previously aerated with O₂. The hippocampi and cortex were dissected out and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper. Slices were transferred immediately to 24-well culture plates, each well containing 0.3 mL of HBSS (Hank's balanced salt solution) for measuring glutamate uptake or slice samples (hippocampus and cortex) were then frozen (-80 °C) for biochemical measurements, described as follows.

2.6 Quantification of S100B and GFAP

S100B content in the hippocampus and CSF was measured by ELISA (Leite et al, 2008). Briefly, 50 μ L of sample plus 50 μ 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 0.019 to 10 ng/mL. ELISA for GFAP was (Tramontina et al, 2007) carried out by coating the microtiter plate with 100 μ L samples containing 30 μ g of protein 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 1h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL.

2.7 Immunohistochemistry for GFAP

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 (Swarowsky et al, 2008). The brains were sectioned (50 µm) on a cryostat (Leitz). The sections were then preincubated in 2% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.4% Triton X-100 for 30 min and incubated with polyclonal anti-GFAP from rabbit, diluted 1:3,000 in 0.4% BSA in PBS-Triton X-100, for 4° C. After washing several times, tissue sections were incubated with a secondary antibody (Alexa Fluor 568 A11011) diluted 1:500 in PBS, at room temperature for 2 h. Afterwards, the sections were mounted on slides with Fluor Save® and covered with coverslips. Images were viewed with a Nikon microscope and images transferred to a computer with digital camera.

2.8 Glutamate uptake assay

Glutamate uptake was measured, as previously described (Gottfried et al, 2002) with some modifications (Thomazi et al, 2004). Briefly, hippocampal slices were transferred to 24-well plates and incubated for 23 min at 37 °C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄ · 7 H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃ and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by the addition of 0.1 mM L-glutamate and 0.33 µCi/mL L-[2,3-³H] glutamate. The incubation was stopped after 5 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. Sodium-independent uptake was determined using *N*-methyl-*D*-glucamine instead of NaCl. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake of the total uptake to obtain the specific uptake. Results (nmol/mg protein/min) are expressed as a percentage of the control.

2.9 Glutamine synthetase (GS) activity

The glutamine synthetase enzymatic assay was performed as described previously (Feoli et al, 2006). Briefly, homogenized tissue samples were added to a reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂; 50 L-glutamate; 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine-HCl; 10 ATP and incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 mL of a solution containing: 370 mM ferric chloride; 670 mM HCl; 200 mM trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ -glutamylhydroxamate treated with ferric chloride reagent. Glutamine synthetase activity was expressed as μ mol/h/mg prot.

2.10 Glutathione (GSH) content assay

GSH levels were measured as previously described (Browne & Armstrong, 1998). This assay detects only the reduced glutathione content. Briefly, slices were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) 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 μ M). Glutathione concentrations were expressed as nmol/mg protein.

2.11 Protein carbonyl assay (Oxyblot™ analyses)

Protein carbonyls were assayed by Western blot analysis in hippocampal slices, according to the manufacturer's instructions (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (S7150); Millipore Corporation, USA). In brief, 15 μ g protein from hippocampal slices obtained in phosphate-buffered saline (PBS) were reacted with 2,4 dinitrophenylhydrazine and Western blotted using a primary antibody specific to dinitrophenylhydrazone-derivatized residues (OxyBlot™) and a secondary antibody (OxyBlot™). Protein carbonyls were visualized by phosphoimaging or revealed using enhanced chemiluminescence and quantified by densitometry. The optical density (O.D.) of the bands was quantified using Scion Image™ (Frederick, MD, USA). Blots were subsequently reprobbed for actin immunoreactivity (1:4,000; Sigma) and revealed using enhanced chemiluminescence (ECL kit, Amersham).

2.12 Western blotting

The hippocampus and cortex were dissected in the cutting buffer and mechanically homogenized (4 °C) in 500 μ l of 50 mM Tris–base pH 7.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 0.1 mM PMSF, 2 mM Na_3VO_4 and then centrifuged (13,000 x g for 10 min at 4 °C) to eliminate cellular debris (Oliveira et al, 2008). The supernatants were individually diluted 1/1 (v/v) with electrophoresis sample buffer a final concentration of 50 mM Tris (pH 6.8), 2 mM EDTA, 4% SDS, 8% glycerol. Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard (Lowry et al, 1951) and concentration was calculated by a pattern curve

with bovine serum albumin. Each sample (40 µg of total protein/track) was electrophoresed in 10% SDS– PAGE minigels, after addition of 0.2% bromophenol blue and 5% β-mercaptoethanol (Cordova et al, 2004). The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (1.2 mA/cm²; 1.5 h) as described by Bjerrum and Heegaard (Bjerrum, 1988) with adaptations (Rigon et al, 2008). The membranes were blocked (1 h) with 5% skimmed milk in TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5). Antibodies were detected using specific antibodies diluted in TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) containing 2.5% BSA in the dilutions: 1:1,000 (anti-phospho-p38^{MAPK}, anti-phospho JNK1/2); 1:10,000 (anti-total- p38^{MAPK}); 1:40,000 (anti-total-ERK1/2); 1:5,000 (anti-total-JNK 1/2, anti-rabbit); 1:2,000 (anti-phospho-ERK 1/2, anti-β-actina); 1:4,000 (anti-mouse); 1:500 (anti-EAAT2/GLT-1). Subsequently, membranes were incubated with anti-rabbit or anti-mouse peroxidase-linked secondary antibody (1:2,000) for 1 h and the chemiluminescence signal was detected using an ECL kit from Amersham. All steps of blocking and incubation were followed by three washes (5 min) of the membranes with TBS-T. The optical density (O.D.) of the bands was quantified using Scion Image™ (Frederick, MD, USA). The phosphorylation level of each protein was determined as a ratio of O.D of the phosphorylated band/O.D. of the total band and the data are expressed as percentages of the control (considered as 100%) and values presented as means ± S.E.M (Posser et al, 2007).

2.13 Protein determination

Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard (Lowry et al, 1951).

2.14 Statistical analysis

Parametric data from the experiments are presented as means \pm standard error and statistically evaluated by Student's *t*-test, assuming $p < 0.05$. The escape latency parameter in the water maze task was evaluated by repeated measures ANOVA, assuming $p < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Behavioral effects

The Morris water maze was used to evaluate reference memory in the two groups, sham and okadaic acid (OA), to 12 days after OA intrahippocampal injection. In the training sessions, there was a significant decline in the average time to find the platform (escape latency) from day 4 onwards in the sham group, when compared to the OA group (Fig. 1A) ($F_{(4,112)}$, $p < 0.05$). In the trial session, OA rats spent less time in the target quadrant, as compared to the sham group (Fig. 1B) ($p = 0.027$). The time to find the platform was significantly lower in the OA group (Fig 1C) ($p = 0.001$), and the number of crossings over the platform location was less, compared with the sham group (Fig. 1D) ($p = 0.001$).

3.2 ELISA for S100B and GFAP

A significant increase in GFAP immunocontent of the hippocampus was observed in rats submitted to OA infusion ($p = 0.025$) (Fig. 2B), this effect in OA group was not found in cerebral cortex ($p = 0.766$). OA did not significantly change S100B immunocontent in both brain regions, cerebral cortex ($p = 0.218$) and hippocampus ($p = 0.190$) (Fig. 3A). Interestingly, a significant decrease in CSF S100B was observed in the OA treated group as compared to the sham group ($p = 0.03$) (Fig. 3B).

3.3 Immunohistochemistry for GFAP

In order to confirm hippocampal astroglial changes observed in rats submitted to OA injection of OA, we carried out a GFAP immunohistochemistry study. The photomicrographs of astrocytes GFAP immunoreactive indicate signs of astrogliosis in CA1 region (Fig. 2A), of the hippocampus in rats submitted to OA infusion.

3.4 Glutamate metabolism in the hippocampus

Glutamate uptake and glutamine synthetase activity were measured in hippocampal slices of sham and OA rats. The infusion of OA did not affect the glutamate uptake in the hippocampus ($p = 0.069$) (Fig. 4A). However, there was a significant decrease in the EAAT2/GLT-1 in the hippocampus in rats submitted to OA infusion ($p = 0.042$) (Fig. 4B), as well as a decrease in glutamine synthetase activity ($p = 0.034$) (Fig. 4C), when compared to the sham group.

3.5 Oxidative stress

Since oxidative stress has been implicated in the pathology of neurodegenerative diseases, the glutathione content (reduced glutathione content) and protein carbonyls were used as parameters to evaluate possible oxidative stress caused by the OA-induced dementia model. Reduced glutathione content was lower in OA-infused rats ($p = 0.039$) (Fig. 5A), when compared to the sham group. This effect in the OA group was not found in the cerebral cortex ($p = 0.870$). A significant increase in the protein carbonyls of the hippocampus was observed in the OA group (Fig. 5B) ($p = 0.027$).

3.6 Effect of OA on MAPKs

An imbalance in the activities of kinases and phosphatases is crucial to tau hyperphosphorylation. The MAPK family might play a role in the hyperphosphorylation of tau in AD brain; the most characterized members of the MAPK family include the ERKs, the SAPKs and p38^{MAPK}, and an increasing number of studies are demonstrating that the activities of these are changed in models of AD. Interestingly, our results demonstrate that after injection of OA, a potent phosphatase inhibitor, activation of p38^{MAPK} phosphorylation occurred (Fig.6A) ($p = 0.043$), while there were no alterations in the phosphorylation of ERK 1/2 (Fig. 6B) and SAPK/JNK 1/2 (Fig. 6C).

4 DISCUSSION

Several types of animal models have been developed to investigate AD, including the OA-induced model by intrahippocampal administration. Memory impairment induced by the injection of OA has been reported, accompanied by remarkable neuropathological changes including hippocampal neurodegeneration, a paired helical filament-like phosphorylation of tau protein, and formation of β -amyloid-containing plaque-like structures, making this model potentially relevant for understanding the development of AD in humans (Arendt et al, 1995; Bennett et al, 2003; He et al, 2001; Kamat et al, 2010). Similarly, in the present study, injection of OA (100 ng) into the dorsal hippocampus induced impairment in reference memory and neurochemical alterations 12 days after the bilateral injection of OA, as evaluated in the Morris water maze task. Consistent with previous reports (Arendt et al, 1998; He et al, 2001), all the parameters evaluated in the water maze task, which are recognized to evaluate hippocampal integrity, were impaired in the OA group.

Astrocytes are involved in a wide range of CNS pathologies. In response to essentially any CNS pathology, astrocytes undergo characteristic changes in appearance, i.e. the hypertrophy

of their cellular processes, a phenomenon referred to as reactive gliosis (Middeldorp & Hol, 2011). Astrogliosis is also a prominent neuropathologic change in AD and the severity of this pathology has been shown to strongly correlate with the density of the reactive astrocytes and the strongly upregulated expression of GFAP, a specific astrocyte marker (Crols et al, 1986; Eng et al, 2000; Noppe et al, 1986). The hippocampus tends to be more severely affected by astrogliosis in AD (Ross et al, 2003). Reactive astrocytes in AD brains are frequently described in association with neuritic plaques (Kato et al, 1998). Studies have shown a strong correlation between GFAP mRNA levels and the density of neuritic plaques in the frontal neocortex (Le Prince et al, 1993) and with the elevation of classical A β density deposits (Pike et al, 1995). In addition, there is also evidence that GFAP correlates inversely with cognitive function (Kashon et al, 2004). Therefore, the astrogliosis, as evaluated by GFAP content (measured by ELISA) and confirmed by immunohistochemistry, reported herein in the hippocampus of rats submitted to okadaic acid-induced injury reinforces the use of this model for AD investigation.

S100B is a calcium-binding protein predominantly expressed and secreted by astrocytes in vertebrate brain (Goncalves et al, 2008; Marenholz et al, 2004). Intracellularly, S100B binds to many protein targets, possibly modulating cytoskeleton plasticity, cell proliferation and astrocyte energy metabolism (Donato, 2001; Van Eldik & Wainwright, 2003). In agreement, high levels of brain tissue S100B have been observed in neurodegenerative disorders, including AD (Rothermundt et al, 2003). It is important to mention that S100B is able to stimulate the protein phosphatase, calcineurin (Leal et al, 2004), which appears to be involved in the inflammatory activation of astrocytes in transgenic AD models (Norris et al, 2005). However, we did not find changes in S100B immunocontent in brain tissue (hippocampus and cerebral cortex). On the other hand, the present study showed that CSF S100B is lower in the OA group. Similarly, a decrease in CSF S100B was also found in other dementia models

using streptozotocin or chronic cerebral hypoperfusion (Rodrigues et al, 2009; Vicente et al, 2009). Interestingly, a decrease in serum S100B was recently observed in AD patients (Chaves et al, 2010), although increased concentrations of CSF S100B at the beginning of AD have been observed (Green et al, 1997; Peskind et al, 2001; Petzold et al, 2003). It has been suggested that S100B plays a role in earlier disease stages by initiating neuritic plaque formation (Peskind et al, 2001; Steiner et al, 2011). It should be noted that the expression and secretion of S100B are not necessarily interdependent events (Goncalves et al, 2008).

Other astroglial parameters, namely glutamate uptake and glutamine synthetase (GS) activities, were investigated in the hippocampus of rats submitted to the okadaic acid-induced dementia model. There is some evidence that the metabolism of glutamate is altered in Alzheimer's disease and that neurons and astrocytes present lower levels of GS (Robinson, 2001). In our model, OA injection did not alter hippocampal glutamate uptake activity. Some reports have demonstrated, through measurements of glutamate uptake and sodium dependent glutamate binding, that the high affinity glutamate uptake system is impaired in AD brains (Tian et al, 2010). A dysfunction in the glutamate uptake system can lead to the accumulation of excessive glutamate in the synapse; it has been shown that decreased glutamate transport activity is associated with decreased EAAT2 protein expression; however, the EAAT2 mRNA level is not affected (Li et al, 1997), suggesting that alterations in EAAT2 expression occur due to disturbances at the post-transcriptional level. Although OA injection apparently did not cause any reduction in glutamate uptake, we observed a significant decrease in EAAT2/GLT-1 in the hippocampus, suggesting a possible dysfunction in the glutamate system in our model of dementia. Studies indicate that the glial glutamate transporter EAAT2 is the quantitatively dominant glutamate transporter and plays a major role in the clearance of glutamate. A dysfunction of EAAT2 has been implicated in the development of several neurodegenerative disorders, including AD (Colton et al, 2010; Kim et al, 2010). In this study, we also observed

a significant reduction in GS activity in the hippocampus of rats injected with OA. The activity of GS in cortical homogenates of AD brain tissue is reduced compared with homogenates from the brains of non-dementia individuals (Smith et al, 1991) and the extent of this reduction correlates with senile plaque burden (Le Prince et al, 1995). The aberrant pattern of GS expression in Alzheimer's disease is consistent with other lines of evidence that indicate a major disruption of glutamate metabolism (Robinson, 2000; Robinson, 2001).

Astrocytes are also responsible for the main antioxidant defense in brain tissue and oxidative stress is a common feature in several neurodegenerative diseases (Jellinger, 2009). There is evidence that dementia is accompanied by oxidative stress and damage of brain tissue (Butterfield et al, 2010). In other models of dementia, oxidative damage has been reported, as evaluated by measuring protein oxidation and decreased of glutathione (GSH) content. In the present study, OA injection caused a significant decrease in GSH levels in the hippocampus, indicating oxidative stress. In fact, the decrease in glutathione content suggests a failure of astroglial antioxidant defense in this model of sporadic AD. In addition, protein carbonylation was increased in our study, in agreement with clinical studies (Markesbery, 1999; Pratico, 2008). Although the initial events of AD are still unknown, numerous studies reported an increase in oxidative stress in the AD brain, as well as in cellular and animal AD models (Nunomura et al, 2006). This suggests that this model could not only mimic the cognitive impairment of AD, but also generate certain oxidative damage, which may be an important contributing factor to AD pathogenesis.

The MAPK signaling pathways regulate many cellular processes, including gene expression, differentiation and cell death (Chang & Karin, 2001), and dysfunction of the effectors comprising these pathways has been linked to many pathological processes. Reactive oxygen species (ROS) are reported to play a key role in cell signaling, and activation of MAPKs is known to play a major role in ROS-signaling pathways. The most characterized members of

the MAPK family include the ERKs, the SAPKs and p38^{MAPK} and an increasing number of studies are demonstrating that the activities of these are changed in models of AD (Morishima et al, 2001). The MAPK family might play a role in the hyperphosphorylation of tau in AD brain. The phosphorylation level of tau is also regulated by protein phosphatases, and the activity of PP2A is specifically decreased in AD brain. Since the MAPK pathway is dynamically regulated by the phosphorylation of each component kinase of the cascade and these kinases can be dephosphorylated by PP2A *in vitro* and in cultured cells, the activated MAPK pathway might possibly result from a decrease in PP2A activity in AD brain (Pei et al, 2003). Interestingly, our results demonstrate that injection of OA, a potent phosphatase inhibitor, activates p38^{MAPK} and does not alter the phosphorylation of ERK 1/2 and SAPK/JNK 1/2. Previous studies provide supporting evidence that the p38^{MAPK} pathway is activated during the early stages of AD and, thus, may contribute to neurodegenerative processes (Sun et al, 2003). Injection of pre aggregated A β ₍₁₋₄₂₎ in rat nucleus basalis resulted in microglial and astrocyte activation and phospho-p38^{MAPK} immunoreactivity that colocalized with microglial cells, but not astrocytes (Giovannini et al, 2002). In transgenic mice for amyloid precursor protein (Swedish mutations) and presenilin-1 (P264L), the p38^{MAPK} pathways were activated in the cerebral cortex (Savage et al, 2002). These data provide evidence that the increased levels of oligomeric A β that occur in the AD brain could activate signaling cascades that increase p38^{MAPK} activity.

5. CONCLUSION

In conclusion, bilateral hippocampal injection of OA induced spatial cognitive deficit and caused oxidative stress in this model and demonstrated, for the first time to our knowledge, neuroglial alterations. Our results in rats submitted to OA injection showed specific astroglial

changes in rats after 12 days of OA injection, namely hippocampal gliosis, based on increased GFAP and decreased GS activity and EAAT-2 content, as well as decreased CSF S100B. These changes have been observed in patients with neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease, and therefore reinforce the importance of this model for the investigation of astrocytes as targets of new therapeutic strategies. Moreover, we observed a decrease in GSH and an increase in protein carbonylation and p38^{MAPK}. These findings contribute to the understanding of disease-associated cognitive deficits and OA toxicity in brain tissue.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

References

- [1] Alzheimer's Association AA. 2008 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2008;4:110-33.
- [2] Weinstock M, Shoham S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. *J Neural Transm.* 2004;111:347-66.
- [3] Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E. Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* 2000;278:169-72.
- [4] Trojanowski JQ, Vandeerstichele H, Korecka M, Clark CM, Aisen PS, Petersen RC, et al. Update on the biomarker core of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative subjects. *Alzheimers Dement.* 2010;6:230-8.
- [5] Silvestrelli G, Lanari A, Parnetti L, Tomassoni D, Amenta F. Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mech Ageing Dev.* 2006;127:148-57.
- [6] Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:4044-8.
- [7] Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med.* 2007;13:54-63.
- [8] Mrak RE, Griffin WS. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2001;22:915-22.
- [9] Eng LF, Ghirmikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000;25:1439-51.
- [10] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:1008-22.
- [11] Goncalves CA, Leite MC, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem.* 2008;41:755-63.
- [12] Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:748-55.
- [13] Pope SA, Milton R, Heales SJ. Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. *Neurochem Res.* 2008;33:1410-8.

- [14] Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 2000;267:4904-11.
- [15] Vicente E, Degerone D, Bohn L, Scornavaca F, Pimentel A, Leite MC, et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res.* 2009;1251:204-12.
- [16] Craft JM, Watterson DM, Hirsch E, Van Eldik LJ. Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. *J Neuroinflammation.* 2005;2:15.
- [17] Lackovic Z, Rebic V, Riederer PF. Single intracerebroventricular injection of botulinum toxin type A produces slow onset and long-term memory impairment in rats. *J Neural Transm.* 2009;116:1273-80.
- [18] Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, Quilfeldt JA, et al. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis.* 2009;17:193-202.
- [19] Swarowsky A, Rodrigues L, Biasibetti R, Leite MC, de Oliveira LF, de Almeida LM, et al. Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res.* 2008;190:206-11.
- [20] Arendt T, Holzer M, Fruth R, Bruckner MK, Gartner U. Phosphorylation of tau, A β -formation, and apoptosis after in vivo inhibition of PP-1 and PP-2A. *Neurobiol Aging.* 1998;19:3-13.
- [21] He J, Yamada K, Zou LB, Nabeshima T. Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J Neural Transm.* 2001;108:1435-43.
- [22] Kamat PK, Tota S, Saxena G, Shukla R, Nath C. Okadaic acid (ICV) induced memory impairment in rats: a suitable experimental model to test anti-dementia activity. *Brain Res.* 2010;1309:66-74.
- [23] Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, et al. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159:871-7.
- [24] Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci.* 1990;15:98-102.

- [25] Cagnoli CM, Kharlamov E, Atabay C, Uz T, Manev H. Apoptosis induced in neuronal cultures by either the phosphatase inhibitor okadaic acid or the kinase inhibitor staurosporine is attenuated by isoquinolinesulfonamides H-7, H-8, and H-9. *J Mol Neurosci*. 1996;7:65-76.
- [26] Zhou XW, Gustafsson JA, Tanila H, Bjorkdahl C, Liu R, Winblad B, et al. Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A. *Neurobiol Dis*. 2008;31:386-94.
- [27] Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Molecular mechanism of Alzheimer's neurofibrillary degeneration and therapeutic intervention. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;777:132-8.
- [28] Braak H, Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 1998;53:127-40.
- [29] Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3beta. *FEBS Lett*. 2002;530:209-14.
- [30] Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett*. 1993;325:167-72.
- [31] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410:37-40.
- [32] Munoz L, Ammit AJ. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2010;58:561-8.
- [33] Paxinos G. *The Rat Nervous System*. Academic Press. 1997;San Diego, CA.
- [34] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47-60.
- [35] Vicente E, Tramontina F, Leite MC, Nardin P, Silva M, Karkow AR, et al. S100B levels in the cerebrospinal fluid of rats are sex and anaesthetic dependent. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:1126-30.
- [36] Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*. 2008;169:93-9.
- [37] Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods*. 2007;162:282-6.
- [38] Gottfried C, Tramontina F, Goncalves D, Goncalves CA, Moriguchi E, Dias RD, et al. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine

and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev.* 2002;123:1333-40.

[39] Thomazi AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E, et al. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev.* 2004;125:475-81.

[40] Feoli AM, Siqueira I, Almeida LM, Tramontina AC, Battu C, Wofchuk ST, et al. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *J Nutr.* 2006;136:2357-61.

[41] Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol.* 1998;108:347-52.

[42] Oliveira CS, Rigon AP, Leal RB, Rossi FM. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *Int J Dev Neurosci.* 2008;26:355-62.

[43] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

[44] Cordova FM, Rodrigues AL, Giacomelli MB, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR, et al. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res.* 2004;998:65-72.

[45] Bjerrum OJ, Heegaard, N.H.H. *CRC handbook of immunoblotting of proteins.* 1988;vol. I.

[46] Rigon AP, Cordova FM, Oliveira CS, Posser T, Costa AP, Silva IG, et al. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK. *Neurotoxicology.* 2008;29:727-34.

[47] Posser T, de Aguiar CB, Garcez RC, Rossi FM, Oliveira CS, Trentin AG, et al. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch Toxicol.* 2007;81:407-14.

[48] Arendt T, Holzer M, Fruth R, Bruckner MK, Gartner U. Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of beta/A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A. *Neuroscience.* 1995;69:691-8.

[49] Bennett PC, Moutsoulas P, Lawen A, Perini E, Ng KT. Novel effects on memory observed following unilateral intracranial administration of okadaic acid, cyclosporin A, FK506 and [MeVal⁴]CyA. *Brain Res.* 2003;988:56-68.

[50] Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 2011;93:421-43.

- [51] Noppe M, Crols R, Andries D, Lowenthal A. Determination in human cerebrospinal fluid of glial fibrillary acidic protein, S-100 and myelin basic protein as indices of non-specific or specific central nervous tissue pathology. *Clin Chim Acta*. 1986;155:143-50.
- [52] Crols R, Saerens J, Noppe M, Lowenthal A. Increased GFAP levels in CSF as a marker of organicity in patients with Alzheimer's disease and other types of irreversible chronic organic brain syndrome. *J Neurol*. 1986;233:157-60.
- [53] Ross GW, O'Callaghan JP, Sharp DS, Petrovitch H, Miller DB, Abbott RD, et al. Quantification of regional glial fibrillary acidic protein levels in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 2003;107:318-23.
- [54] Kato S, Gondo T, Hoshii Y, Takahashi M, Yamada M, Ishihara T. Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque morphology and relationship between senile plaques and astrocytes. *Pathol Int*. 1998;48:332-40.
- [55] Le Prince G, Delaere P, Fages C, Duyckaerts C, Hauw JJ, Tardy M. Alterations of glial fibrillary acidic protein mRNA level in the aging brain and in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurosci Lett*. 1993;151:71-3.
- [56] Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1995;132:172-9.
- [57] Kashon ML, Ross GW, O'Callaghan JP, Miller DB, Petrovitch H, Burchfiel CM, et al. Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *J Alzheimers Dis*. 2004;6:595-604; discussion 73-81.
- [58] Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:1111-22.
- [59] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33:637-68.
- [60] Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 2003;21:97-108.
- [61] Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech*. 2003;60:614-32.
- [62] Leal RB, Frizzo JK, Tramontina F, Fieuw-Makaroff S, Bobrovskaya L, Dunkley PR, et al. S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport*. 2004;15:317-20.

- [63] Norris CM, Kadish I, Blalock EM, Chen KC, Thibault V, Porter NM, et al. Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. *J Neurosci*. 2005;25:4649-58.
- [64] Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation*. 2010;7:6.
- [65] Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN. Increased S100beta in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett*. 1997;235:5-8.
- [66] Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2001;39:409-13.
- [67] Petzold A, Jenkins R, Watt HC, Green AJ, Thompson EJ, Keir G, et al. Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2003;336:167-70.
- [68] Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein HG. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:409-24.
- [69] Robinson SR. Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2001;66:972-80.
- [70] Tian G, Kong Q, Lai L, Ray-Chaudhury A, Lin CL. Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2010;113:978-89.
- [71] Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56:901-11.
- [72] Kim K, Lee SG, Kegelman TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, et al. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol*. 2010.
- [73] Colton CK, Kong Q, Lai L, Zhu MX, Seyb KI, Cuny GD, et al. Identification of translational activators of glial glutamate transporter EAAT2 through cell-based high-throughput screening: an approach to prevent excitotoxicity. *J Biomol Screen*. 2010;15:653-62.

- [74] Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:10540-3.
- [75] Le Prince G, Delaere P, Fages C, Lefrancois T, Touret M, Salanon M, et al. Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochem Res*. 1995;20:859-62.
- [76] Robinson SR. Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochem Int*. 2000;36:471-82.
- [77] Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm*. 2009;116:1111-62.
- [78] Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, Tang H, Sowell RA, Spilman P, et al. In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP. *Free Radic Biol Med*. 2010;48:136-44.
- [79] Markesbery WR. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1999;56:1449-52.
- [80] Pratico D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:70-8.
- [81] Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65:631-41.
- [82] Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, et al. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci*. 2001;21:7551-60.
- [83] Pei JJ, Gong CX, An WL, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, et al. Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2003;163:845-58.
- [84] Sun A, Liu M, Nguyen XV, Bing G. P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol*. 2003;183:394-405.
- [85] Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, et al. Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis*. 2002;11:257-74.

[86] Savage MJ, Lin YG, Ciallella JR, Flood DG, Scott RW. Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition. *J Neurosci.* 2002;22:3376-85.

Legends to the Figures:

Figure 1- Cognitive performance of rats submitted to intrahippocampal-OA injection (100 ng), as evaluated in the water maze. **(A)** Performance in the reference memory protocol, based on escape latency. Each line represents the mean \pm standard error. *Significant differences were detected from day 4 onwards when compared to the control group (N = 10, repeated measures analysis of variance, $p < 0.05$); **(B)** Memory in the probe trial of reference memory, as measured by time spent (in s) in the target quadrant. Values are mean \pm standard error. *Significant differences from the control group (N = 10, Student's test, $p < 0.05$). **(C)** The time to find the platform. Values are mean \pm standard error. *Significant differences from the control group (N = 10, Student's test, $p < 0.05$). **(D)** Number of crossings over the platform position. Values are mean \pm standard error. *Significant differences from the control group (N = 10, Student's test, $p < 0.05$).

Figure 2- GFAP in hippocampus of rats submitted to OA injection. Adult rats were submitted to intrahippocampal injection of OA (100 ng) for 12 days. Hippocampi were dissected out and the immunohistochemistry for GFAP (panel **A**) and contents of GFAP (measured by ELISA) (panel **B**) were realized. Values are mean \pm standard error of 10 rats in each group. *Significant differences from control (Student's test, $p < 0.05$). Representative

photomicrographs showing GFAP immunoreactive in the radiatum layer of CA1 region of sham and OA groups.

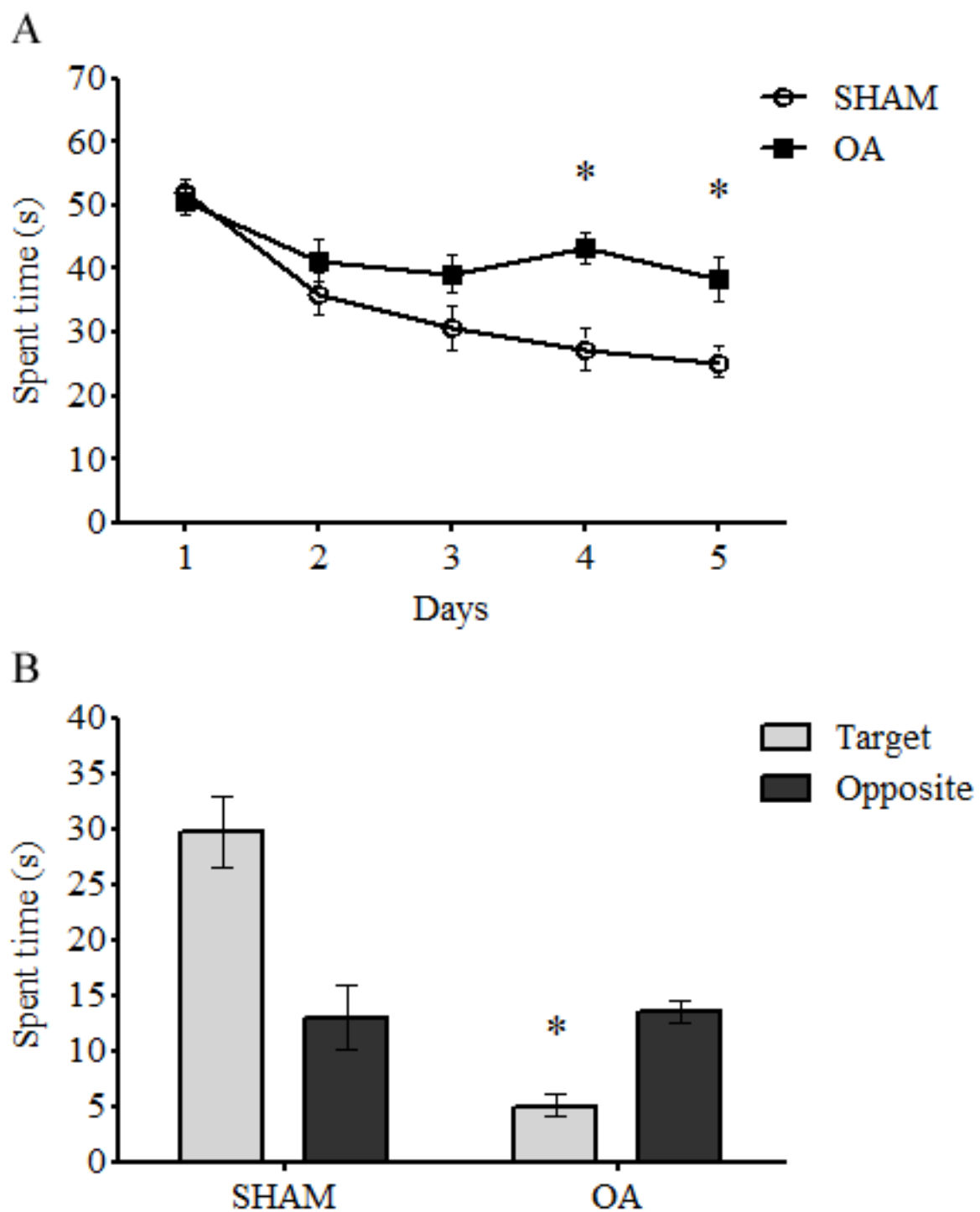
Figure 3- S100B of rats submitted to AO injection. Adult rats were submitted to intrahippocampal injection of OA (100 ng) for 12 days. Cerebrospinal fluid (CSF) was collected by cistern magna puncture and the content of S100B CSF (panel **B**) and S100B contents in hippocampus (panel **A**) were measured by ELISA. Values are mean \pm standard error of 10 rats in each group. *Significant differences from control (Student's test, $p < 0.05$).

Figure 4- Glutamate uptake and glutamine synthetase activity in the hippocampus of rats submitted to AO injection. Adult rats were submitted to intrahippocampal injection of OA (100 ng) for 12 days. Hippocampi were dissected out and chopped into 0.3 mm slices for the measurement of glutamate uptake (panel **A**) and EAAT2/GLT-1 (panel **B**) or homogenized for measurement of glutamine synthetase activity (in panel **C**). Values are mean \pm standard error of 10 rats in each group (A and C). The data are expressed as percentages of the control (considered as 100%) (B). Values are mean \pm standard error of 8 rats in each group. *Significant differences from control (Student's test, $p < 0.05$).

Figure 5- Glutathione content (reduced glutathione content) and protein carbonyls in the hippocampus of rats submitted to AO injection. Adult rats were submitted to intrahippocampal injection of OA (100 ng) for 12 days. Hippocampi were dissected out and homogenized for the measurement of glutathione (panel **A**) or protein carbonyls (Oxyblot™) (panel **B**). Values are mean \pm standard error of 8 rats in each group. *Significant differences from control (Student's test, $p < 0.05$).

Figure 6- Effect on MAPK's in the hippocampus of rats submitted to AO injection. Adult rats were submitted to intrahippocampal injection of OA (100 ng) for 12 days. Hippocampi were dissected out and chopped into 0.3mm and slices were homogenized using SDS-stopping solution and proteins were separated by one-dimensional electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. Phosphorylation of p38^{MAPK}, JNK 1/2, ERK 1/2 was detected by specific antibodies against the biphosphorylated region of the kinase and reactions were developed by ECL. The panel shows representative Western blots demonstrating the phosphorylation of p38^{MAPK} (A), JNK 2 (bar gray) and JNK 1 (bar black) (B), ERK 1 (bar gray) and ERK 2 (bar black) (C). The data are expressed as percentages of the control (considered as 100%). Values are mean \pm standard error of 8 rats in each group. *Significant differences from control (Student's test, $p < 0.05$).

Figure 1



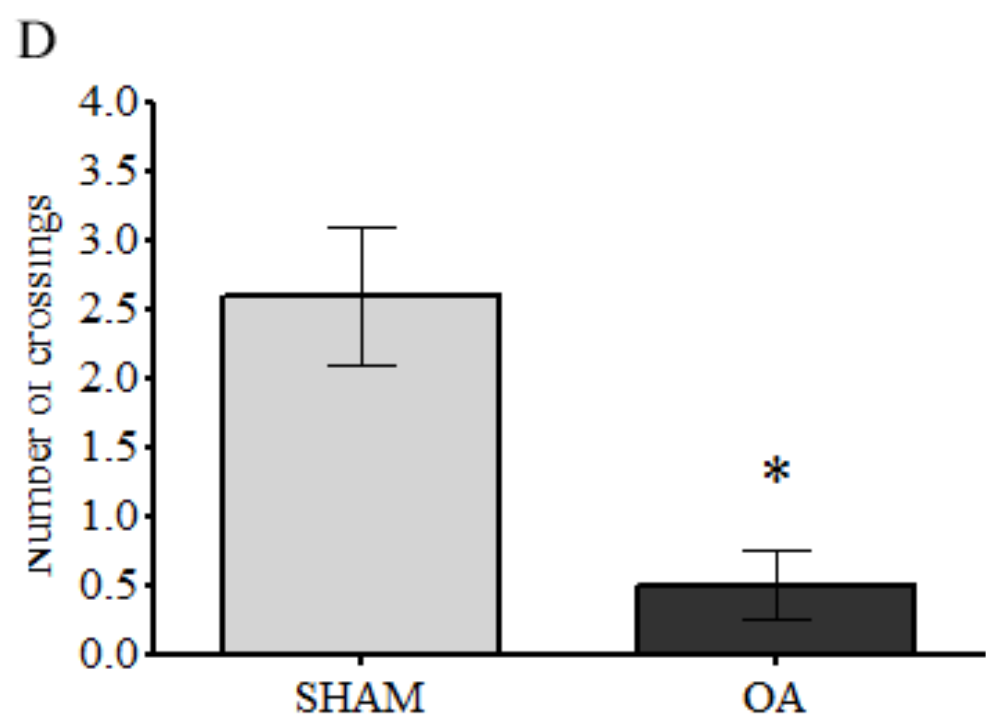
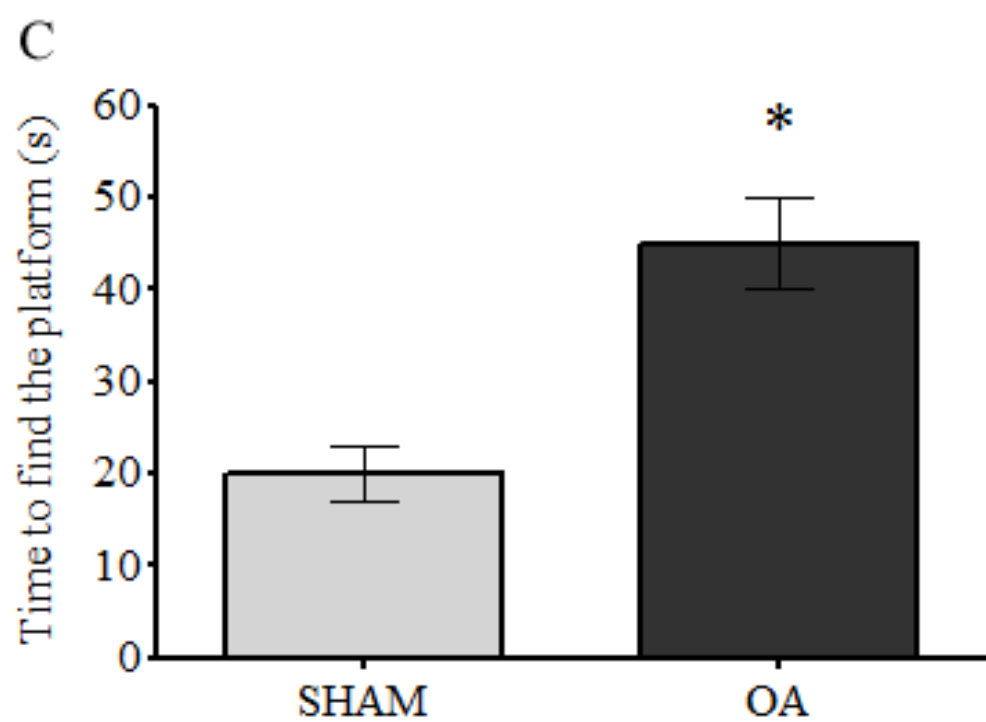
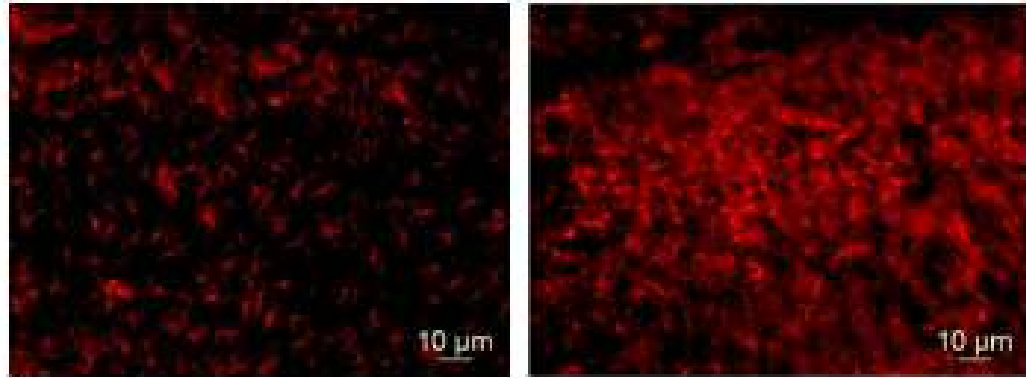


Figure 2

A



B

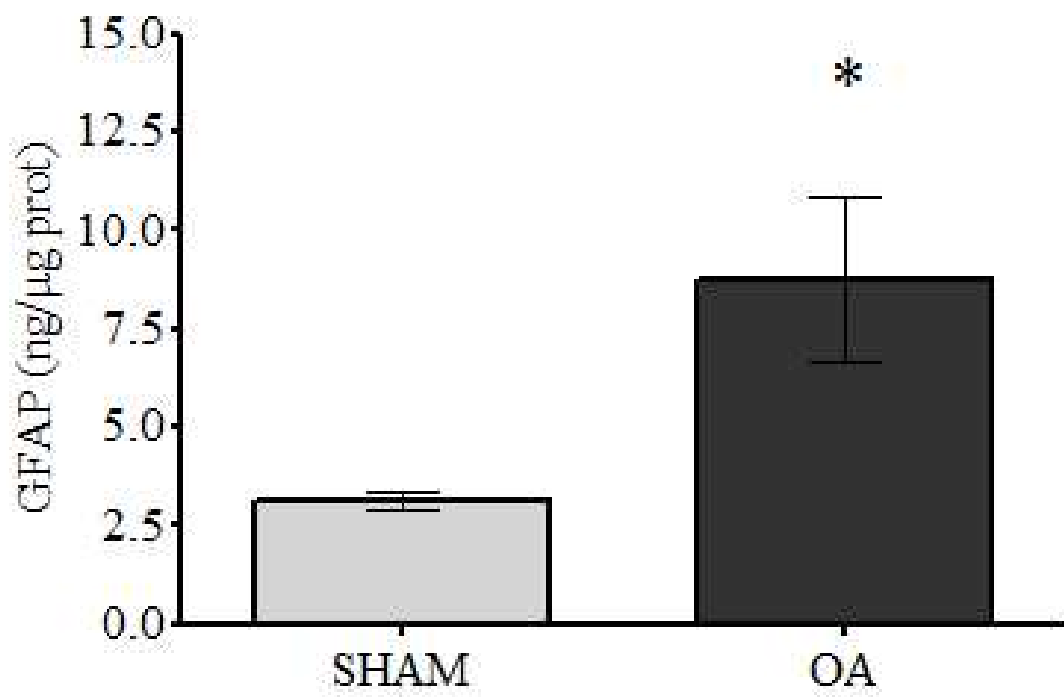


Figure 3

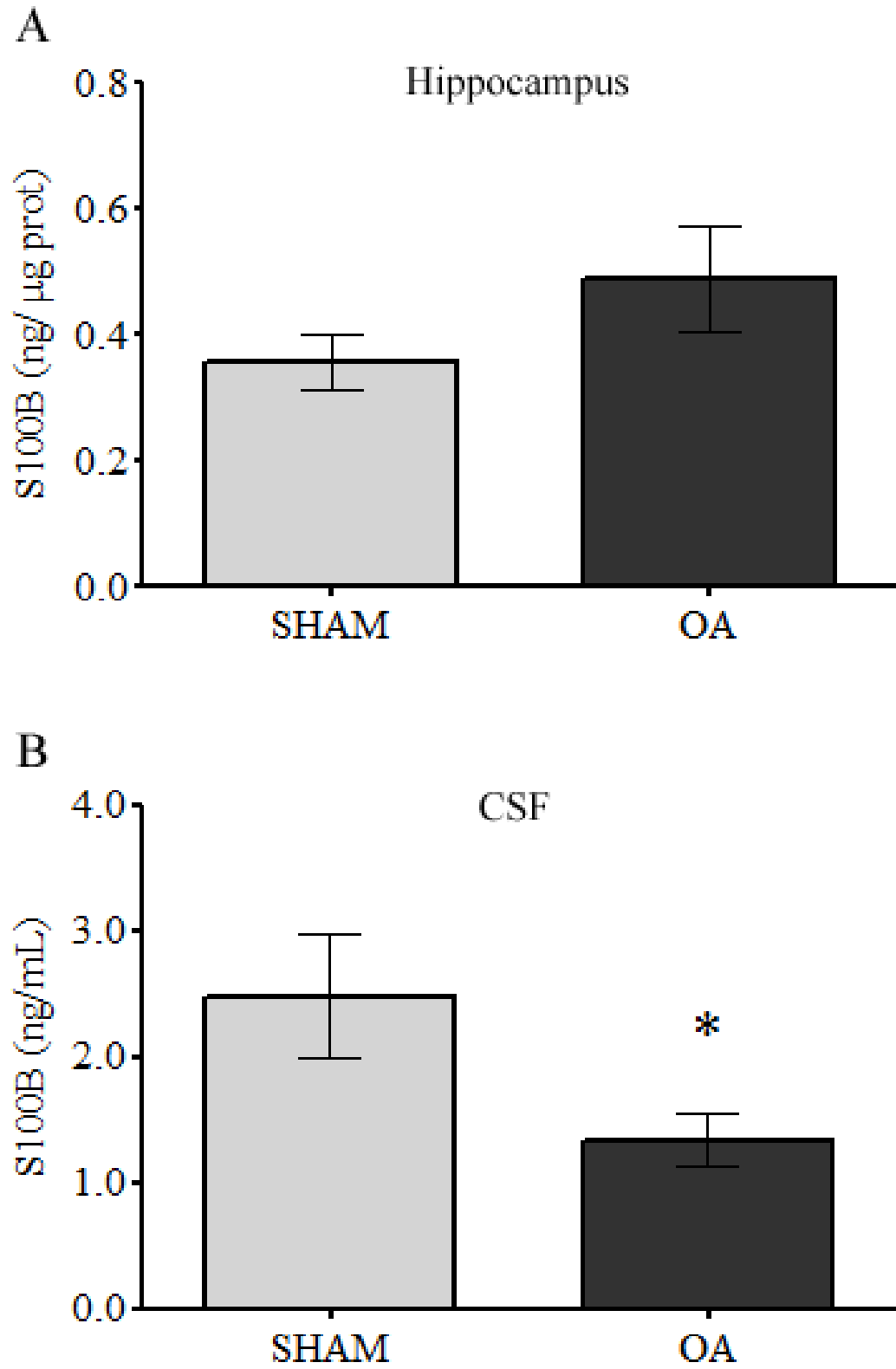


Figure 4

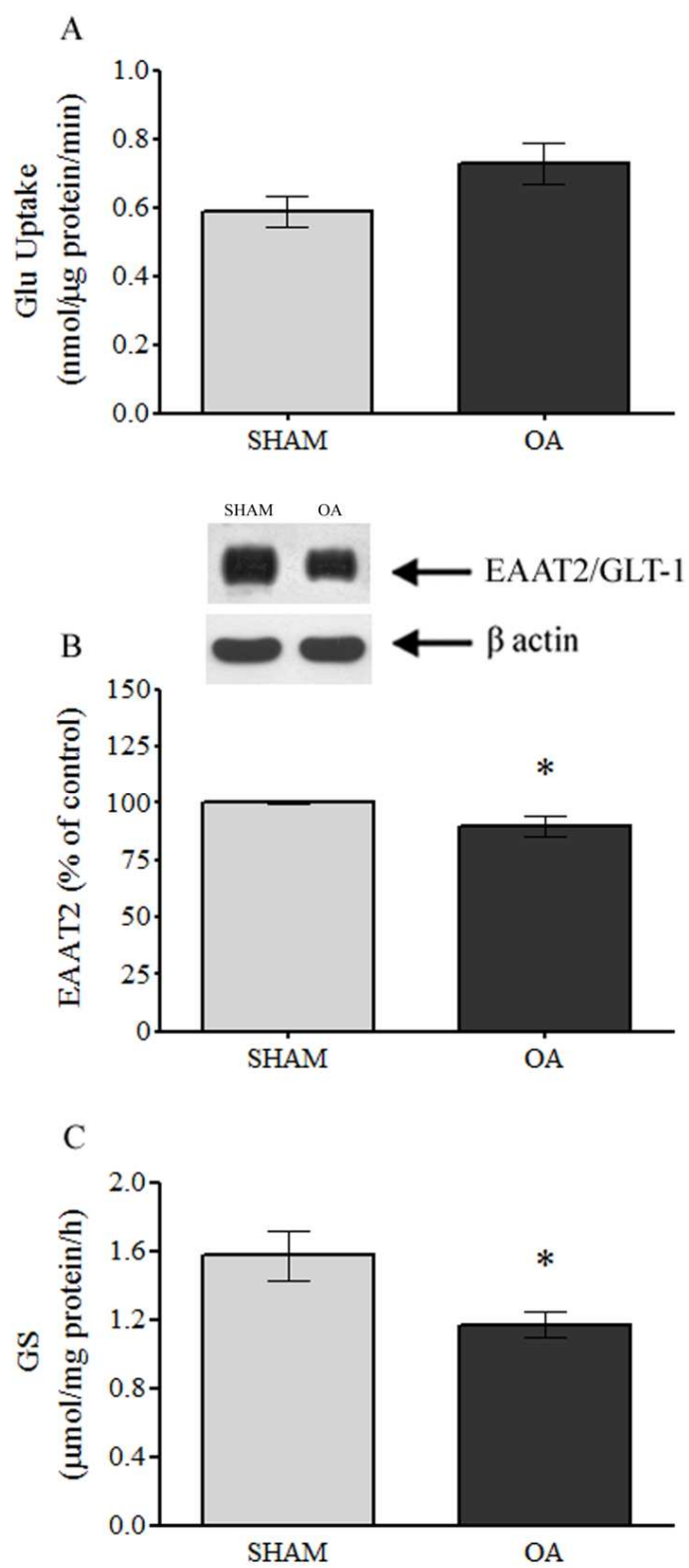


Figure 5

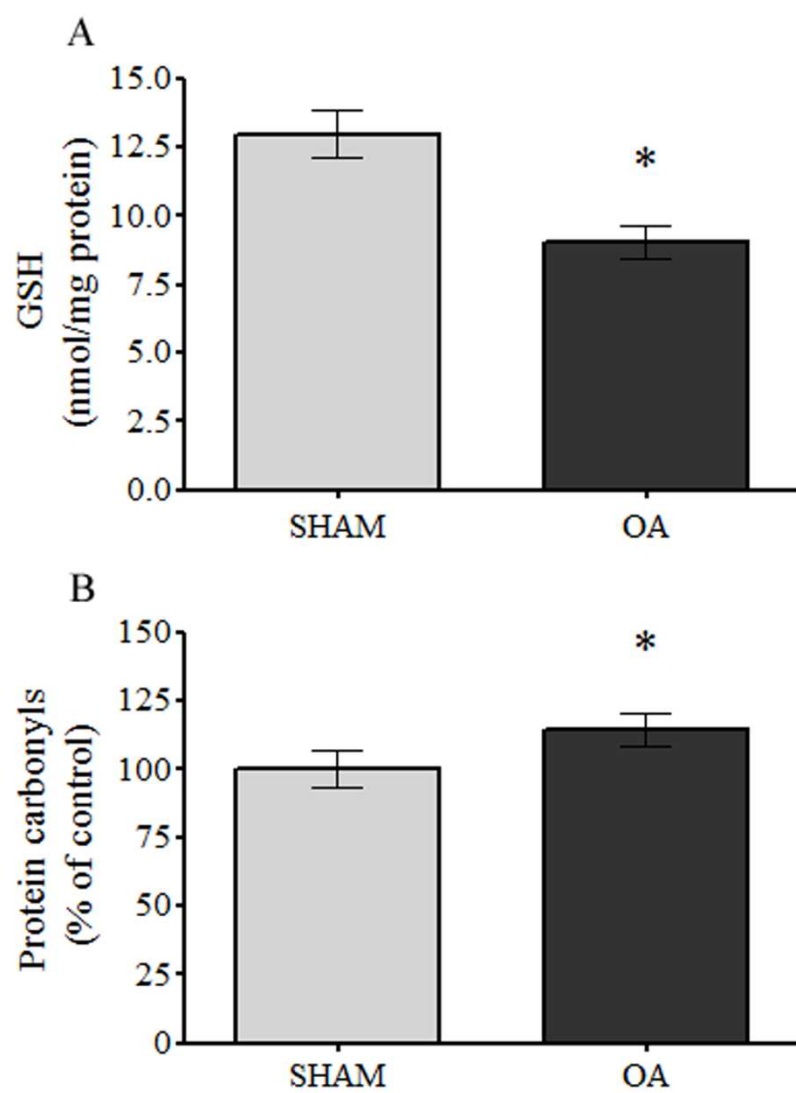
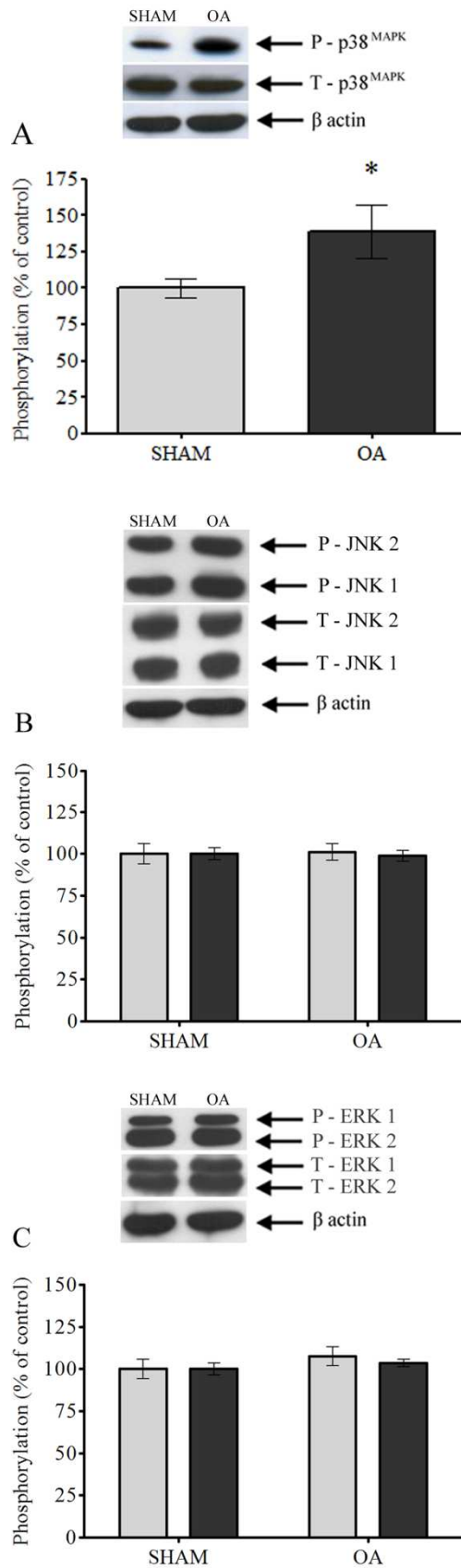


Figure 6



PARTE III

DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer (DA) é marcada por uma perda cognitiva progressiva e irreversível, com deficiências na capacidade do indivíduo em formar novas memórias, bem como, lembrar acontecimentos recentes, entre outros distúrbios neuropsiquiátricos como alteração no humor e personalidade (Cummings et al, 1994; Selkoe, 2001). Diversos modelos animais têm sido desenvolvidos para investigar a etiologia da DA, embora ainda não estabelecida, muitos fatores de riscos e alterações patológicas tem sido utilizados para a elaboração de modelos *in vivo* e *in vitro* da DA. Prejuízo na memória induzido pela infusão de ácido oadáico (AO) em regiões específicas do encéfalo tem sido observado em estudos prévios (Arendt et al, 1998; Kamat et al, 2010). Acompanhado por alterações neuropatológicas, incluindo a neurodegeneração hipocampal, a formação de placas neuríticas extracelulares contendo o peptídeo β -amilóide (A β) e emaranhados neurofibrilares (NFTs) compostos de formas hiperfosforiladas da proteína tau (Arendt et al, 1995; Bennett et al, 2003; He et al, 2001; Kamat et al, 2010). Observadas as características apresentadas e outras a ser discutido neste trabalho, o modelo de infusão intrahipocampal de AO apresenta-se potencialmente relevante para o estudo do desenvolvimento DA. Semelhantemente, no presente estudo, a injeção intrahipocampal de AO (100 ng) induziu um déficit cognitivo, avaliado no teste de memória espacial no labirinto aquático de Morris, e causou alterações neurogliais no período de 12 dias após a injeção bilateral de AO. Todos os parâmetros avaliados no teste de memória espacial no labirinto aquático de Morris, os quais foram utilizados para avaliar a integridade do hipocampo dos animais submetidos ao modelo apresentaram-se prejudicados no grupo injetado com AO quando comparado ao grupo controle. Nossos resultados mostraram que a infusão de AO promove um aumento de GFAP, proteínas carboniladas e fosforilação de p38^{MAPK}, e uma redução de S100B no LCR, conteúdo de glutatona, atividade de glutamina sintetase e do transportador EAAT2/GLT-1, não alterando parâmetros como captação de glutamato, imunoconteúdo de S100B e outras MAPKs, como JNK 1/2 e ERK 1/2. A hipótese para este estudo é que a infusão de AO como modelo animal de demência induz alterações astrogliais, as quais podem ser relacionadas com uma disfunção cognitiva.

Os astrócitos são as principais células gliais com uma ampla variedade de funções adaptativas no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (Nagele et al, 2004). Estão envolvidos em diversas patologias do SNC, em resposta a insultos, os astrócitos sofrem

alterações na sua morfologia, ocorrendo uma hipertrofia de seus processos celulares, fenômeno conhecido como gliose reativa (Middeldorp & Hol, 2011). De fato, a lesão no SNC, seja como consequência de um trauma, doenças hereditárias, ou insulto químico, faz com que os astrócitos tornem-se reativos, uma condição caracterizada por um aumento da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), uma proteína marcadora específica de astrócitos (Eng et al, 2000; O'Callaghan & Sriram, 2005). Astrogliose também pode ser considerada uma característica marcante na DA, e pode-se relacionar esse aumento na densidade dos astrócitos com o aumento na expressão da proteína GFAP, nos tecidos e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DA (Noppe et al, 1986). No encéfalo, o hipocampo tende a ser a região mais afetada por astrogliose, em geral, apresentando uma resposta glial mais proeminente que em outras regiões do cérebro (Ross et al, 2003). Estudos demonstraram uma forte correlação entre os níveis de mRNA GFAP e a densidade de placas neuríticas no córtex frontal (Le Prince et al, 1993), bem como, com o aumento de A β (Pike et al, 1995). Além disso, há também evidências de que há uma correlação negativa entre GFAP e a função cognitiva (Kashon et al, 2004). Seguindo essas evidências da presença de astrogliose em modelos de DA, neste estudo foi avaliado o imunocontéudo de GFAP (mensurado por ELISA) e confirmado por imunohistoquímica, determinando a presença de astrogliose no hipocampo de ratos submetidos à injeção de ácido ocadáico como modelo de demência.

S100B é uma proteína ligante de cálcio predominantemente expressa e secretada por astrócitos no cérebro de vertebrados (Goncalves et al, 2008; Marenholz et al, 2004). Intracelularmente, S100B liga-se a diversas proteínas, possivelmente atuando na modulação da plasticidade do citoesqueleto, proliferação celular e metabolismo energético dos astrócitos (Donato, 2001; Van Eldik & Wainwright, 2003). De acordo com estudos realizados, altos níveis de S100B no tecido cerebral tem sido observados em doenças neurodegenerativas, incluindo DA (Rothermundt et al, 2003). Importante mencionar também, que S100B é capaz de estimular a proteína calcineurina (Leal et al, 2004), que parece estar envolvida na ativação do processo inflamatório em astrócitos, vistos em modelos animais transgênicos da DA (Norris et al, 2005). No presente trabalho não foram observadas alterações no imunocontéudo de S100B em tecido cerebral, córtex e hipocampo (mensurado por ELISA). Por outro lado, pode ser observada uma diminuição na quantidade de S100B no LCR, achado também verificado em outros modelos animais não-transgênicos da DA realizados pelo nosso grupo de estudo (Rodrigues et al, 2009; Vicente et al, 2009). Trabalhos também têm demonstrado uma diminuição de S100B no soro de pacientes com DA (Chaves et al, 2010). Como também,

estudos observaram alterações discretas nas concentrações de S100B no LCR de pacientes com DA (Green et al, 1997; Petzold et al, 2003), sugerindo um papel para S100B nos estágios iniciais da doença, possivelmente durante a formação das placas neuríticas (Peskind et al, 2001; Steiner et al, 2011). Estudos anteriores do nosso grupo mostraram eventos independentes da S100B, quando relacionando sua expressão e secreção (Goncalves et al, 2008).

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC, consideradas como células versáteis são responsáveis por diversas funções, entre elas manter os níveis de neurotransmissores, incluindo o glutamato (Danbolt, 2001). Glutamato é um neurotransmissor essencial na regulação das funções cerebrais. O transportador de aminoácido excitatório 2 (EAAT2/GLT-1) é um dos principais transportadores de glutamato, expresso predominantemente em células astrogliais, responsável pela captação de 90% do glutamato na fenda sináptica (Kim et al, 2010). Um comprometimento no sistema de captação do glutamato pode levar ao acúmulo excessivo de glutamato na fenda sináptica, condição essa conhecida por causar uma excitotoxicidade na célula, que tem sido relacionada com uma falha no transporte de glutamato, associado com uma diminuição, seja pela disfunção ou redução na expressão, no transportador EAAT2/GLT-1 (Li et al, 1997). Há algumas evidências na literatura com relação a alterações no metabolismo do glutamato na DA, e presença de baixos níveis de glutamina sintetase, em neurônios e astrócitos (Robinson, 2001). Parâmetros astrogliais, como a captação de glutamato e atividade da glutamina sintetase foram avaliadas no hipocampo dos ratos submetidos ao ácido ocaídico. No modelo de demência utilizado nesse trabalho, avaliando alterações neurogliais, não foram observadas diferenças significativas na captação de glutamato realizada em fatias hipocampais de ratos injetados com AO quando comparados ao grupo controle. Importantes estudos têm demonstrado, através da medida da captação de glutamato, específica e inespecífica, que o sistema de alta afinidade para a captação do glutamato está prejudicado na DA (Tian et al, 2010). No presente trabalho, mostramos que esse mau funcionamento no metabolismo do glutamato, embora não diminuída a captação de glutamato, foi inferido pelo fato do transportador EAAT2/GLT-1 apresentar-se diminuído no modelo proposto, corroborando com estudos prévios, onde foram relatados diminuição na quantidade do transportador de aminoácido excitatório 2 em modelos da DA (Jacob et al, 2007; Li et al, 1997). Neste estudo, também foi observado uma redução significativa na atividade da glutamina sintetase em hipocampo de ratos injetados com AO. E a atividade da GS em homogeneizados de tecido cerebral cortical é reduzida quando

comparada com cérebros não-dementes, do tipo DA (Smith et al, 1991), e essa redução está relacionada a formação de placa senil (Le Prince et al, 1995). O padrão de atividade diminuída da GS encontrado no nosso estudo é consistente com outras linhas de evidências que indicam essa diminuição como uma grande ruptura no metabolismo do glutamato (Robinson, 2000; Robinson, 2001).

Os astrócitos são responsáveis pelas principais defesas antioxidantes no tecido cerebral, e o estresse oxidativo apresenta-se como uma característica comum em várias doenças neurodegenerativas, inclusive na DA (Jellinger, 2009). Há evidências de que a demência é acompanhada por estresse oxidativo e dano ao tecido cerebral (Butterfield et al, 2010). O estresse oxidativo é comumente visto como uma condição sob a qual a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentro de um sistema celular excede a capacidade de defesa antioxidante endógena levando aos danos oxidativos envolvendo lipídios, DNA e proteínas. Dada a multiplicidade de fontes envolvidas na geração de ERO e a variedade de defesas antioxidantes, enzimáticas e não-enzimáticas, a condição de estresse oxidativo é mais frequentemente inferida quando baseada na presença de um excesso de danos oxidativos a macromoléculas (Yan & Forster, 2011). Entre os numerosos produtos de oxidação, a carbonilação de proteínas pode ser o tipo mais utilizado de dano para inferir o estresse oxidativo em doenças (Stadtman, 2001), em parte, baseado no fato de que as modificações na carbonila podem ser produzidas por uma grande variedade de ERO, que modificam os aminoácidos por reações em cadeias através de agregados de proteínas suscetíveis a degradações proteolíticas, durante esse processo alguns aminoácidos são convertidos em derivados de carbonil; bem como por subprodutos de oxidação lipídica. No entanto, carbonilação em proteínas específicas são consideradas de importância adicional, além do seu uso como biomarcador de algumas doenças, servindo como sinais biológicos (Wong et al, 2010), podem também inferir a perda irreversível da função de proteínas relacionadas a doenças específicas (Sorolla et al, 2008; Sultana et al, 2010). Contudo, a existência de mecanismos específicos de carbonilação de proteínas é bem documentado no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas (Picklo et al, 2002; Stadtman, 2001).

No modelo proposto por este trabalho para o estudo da DA, o estresse oxidativo foi observado por meio da medição da quantidade de proteínas carboniladas no hipocampo, e conteúdo de glutathiona (GSH; conteúdo de glutathiona reduzida). No presente estudo, os níveis de proteínas carboniladas apresentaram-se aumentados no hipocampo de ratos expostos ao

AO como modelo de demência, consistente com estudos clínicos prévios que encontraram esse aumento de proteínas carboniladas em pacientes com DA (Markesbery, 1999; Pratico, 2008), e em modelos animais da DA (Zhang & Simpkins, 2010). Outro parâmetro de estresse oxidativo foi investigado neste trabalho, o conteúdo de GSH (na sua forma reduzida) foi avaliado em ratos submetidos à injeção de AO, e apresentou-se diminuído significativamente no hipocampo, indicando estresse oxidativo. De fato, a diminuição no conteúdo de glutathione sugere uma falha na defesa antioxidante astrogliar neste modelo de DA esporádica. Sabe-se que o fornecimento de GSH e de seus precursores para os neurônios parece estar afetado na DA e este fornecimento é, em grande parte, dependente do adequado funcionamento dos astrócitos (Calabrese et al, 2006). Neste contexto, a redução no conteúdo de glutathione reduzida, principal antioxidante do SNC, pode estar associada com o desenvolvimento de alterações presentes em doenças neurodegenerativas, como a DA. Embora os eventos iniciais da DA ainda sejam desconhecidos, vários estudos relatam um aumento do estresse oxidativo cerebral na DA, bem como em modelos celulares e animais da DA (Nunomura et al, 2006). Isso sugere que o nosso modelo não só poderia mimetizar o comprometimento cognitivo da DA, mas também, gerar estresse oxidativo, o que poderia ser um fator importante que contribuiria para a patogênese da DA.

As vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) regulam muitos processos celulares, incluindo expressão gênica, diferenciação e morte celular (Chang & Karin, 2001), e uma disfunção nessas vias tem sido associada a vários processos patológicos. ERO são relatados por desempenhar um papel fundamental na sinalização celular, ativando diversas MAPKs. Os membros mais caracterizados da família das MAPKs incluem a ERK 1/2, SAPK/JNK 1/2 e p38^{MAPK}, e um número crescente de estudos tem relacionado alterações na atividade dessas proteínas cinases em modelos de DA (Morishima et al, 2001). A família das MAPKs tem sido implicadas na hiperfosforilação anormal da proteína tau na DA (Pei et al, 2003). O nível de fosforilação da proteína tau também pode ser regulado por proteínas fosfatases, e se sabe, por estudos prévios que a atividade da proteína fosfatase 2A (PP2A) apresenta-se diminuída na DA (Gong et al, 1995; Gong et al, 1993). Uma vez que a via de sinalização das MAPKs é dinamicamente regulada pela fosforilação de cada componente cinase da cascata, e estes podem ser desfosforilados por PP2A *in vitro* e em células cultivadas, a ativação da via das MAPKs, eventualmente, pode resultar de uma diminuição da atividade de PP2A em cérebro de pacientes com a DA (Pei et al, 2003). Nossos resultados demonstraram que a injeção intrahipocampal de AO, um potente inibidor de

fosfatase, levou à ativação da p38^{MAPK}, aumentando sua fosforilação; e não alterou a fosforilação da ERK 1/2 e SAPK/JNK 1/2. Estudos anteriores abordaram a via de sinalização da p38^{MAPK}, inferindo sua ativação nas fases iniciais da DA e, portanto, contribuindo para os processos neurodegenerativos (Sun et al, 2003). Um dos primeiros estudos a mostrar uma ativação na p38^{MAPK} em cérebro de pacientes com DA foi realizado por Hensley e colaboradores (1999) (Hensley et al, 1999). Injeção de A β (1-42) no *nucleus basalis* de ratos resultou na ativação da microglia e astrócitos, e foi observado um aumento na fosforilação de p38^{MAPK} co-localizada com células da microglia ativada, mas não com astrócitos (Giovannini et al, 2002). Em ratos transgênicos para a proteína precursora amilóide (Swedish mutations) e presenilina (P264L) as vias da p38^{MAPK} foram ativadas no córtex cerebral (Savage et al, 2002). Estes dados fornecem evidências de que o aumento nos níveis de A β que ocorre na DA poderia ativar vias de sinalização que aumentam a atividade de p38^{MAPK}.

Sabe-se, de estudos prévios que a captação de glicose no encéfalo de pacientes com DA está prejudicada (Freemantle et al, 2006) e, pelo menos em parte, este prejuízo é causado por uma redução na captação de glicose glial (Alexander et al, 2002). Diversos estudos indicam que a deficiência ou estado de resistência de insulina encefálica são características do quadro tardio da DA do tipo esporádica (de la Monte & Wands, 2005). O mecanismo pelo qual esta alteração ocorre, pode ser em parte pelo mau funcionamento do receptor de insulina (RI), tanto no modelo experimental quanto na patogenia da DA, resultando em características neuroquímicas e morfológicas da doença, diretamente relacionadas com a transdução de sinal do RI (de la Monte, 2009). De maneira resumida, quando a insulina se liga ao seu receptor, este recruta seu substrato (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). Assim que ativada, a PI3K converte o lipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, também chamado PIP₂, até fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (IP₃). Quando ligado a PIP₃, a proteína cinase B (PKB), também conhecida como AKT, é fosforilada e ativada por outra cinase, PDK1. Por outro lado, a AKT além de promover o aporte de glicose para os tecidos dependentes de insulina, é capaz de modular, por fosforilação, a atividade da glicogênio sintase-3 (GSK3 β) a qual pode fosforilar a proteína tau (Salkovic-Petrisic et al, 2006). Embora muitas proteínas cinases tenham sido consideradas proteínas em potencial na fosforilação da tau, até agora, apenas algumas são consideradas, como a GSK3 β e a cdk5 (Billingsley & Kincaid, 1997).

No modelo de demência proposto por este estudo, verificou-se uma possível redução na captação de glicose dos ratos submetidos à injeção com AO. Bem como, o envolvimento da via PI3K/AKT na hiperfosforilação da proteína tau. Não foram observadas alterações na captação de glicose (vide anexo, pág. 80), excluindo, em parte o envolvimento do metabolismo da glicose no modelo de demência por infusão do AO, o qual é sabido estar alterado na DA (Freemantle et al, 2006). A fosforilação da GSK3 β não foi alterada (vide anexo, pág 81), bem como a atividade da AKT (vide anexo, pág 82) manteve-se normal nos ratos injetados com AO quando comparados ao grupo controle. A ativação da GSK3 β é mediada pela desfosforilação do sítio de serina 9 (Ser 9), o qual é regulado pela AKT (Grimes & Jope, 2001). Embora evidências sustentem que GSK3 β , altamente expressa no encéfalo, é reconhecidamente a proteína cinase que fosforila a tau *in vivo* (Ishiguro et al, 1993), a GSK3 β pode não ter sido a maior contribuinte para a fosforilação da tau no nosso modelo. Dados da literatura indicam outra proteína cinase como responsável pela fosforilação da tau *in vivo*, a cdk5 (Uchida et al, 1994). Cdk5 é membro da família das proteínas cdk, ativa por p35 e p39, e possivelmente, responsável pela hiperfosforilação da tau pelo ácido ocaídico no nosso modelo (Chen et al, 2005; Lim et al, 2010; Zhang & Simpkins, 2010), como demonstrado em estudos prévios com infusão de AO como modelo de taupatia e deficit cognitivo em ratos (Zhang & Simpkins, 2010).

CONCLUSÕES

Em conclusão, a injeção bilateral de AO foi capaz de induzir um déficit cognitivo espacial e estresse oxidativo no modelo de demência proposto, e pela primeira vez ao nosso conhecimento, alterações astrogliais em modelo de demência induzido pelo AO. Nossos resultados foram obtidos de ratos submetidos à injeção intrahipocampal de AO durante 12 dias. Essas alterações nos parâmetros avaliados pelo nosso estudo já foram apresentadas em pacientes com doenças neurodegenerativas, incluindo a DA, e assim reforçam a importância do modelo para a investigação do envolvimento de astrócitos, e dele como possível alvo de novas estratégias terapêuticas.

Por fim, as alterações astrogliais observadas neste modelo de demência contribuem para a compreensão da fisiopatologia da DA e de outras doenças acompanhadas de déficit cognitivo, bem como contribuem para a identificação de alvos terapêuticos para a DA.

REFERÊNCIAS

Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A (2007) Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci* **12**: 332-343

Alexander CL, Fitzgerald UF, Barnett SC (2002) Identification of growth factors that promote long-term proliferation of olfactory ensheathing cells and modulate their antigenic phenotype. *Glia* **37**(4): 349-364

Allen NJ, Barres BA (2005) Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **15**(5): 542-548

Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* **457**(7230): 675-677

Alzheimer's Association AA (2008) 2008 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **4**(2): 110-133

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**(5): 208-215

Arendt T, Holzer M, Fruth R, Bruckner MK, Gartner U (1995) Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of beta/A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A. *Neuroscience* **69**(3): 691-698

Arendt T, Holzer M, Fruth R, Bruckner MK, Gartner U (1998) Phosphorylation of tau, Abeta-formation, and apoptosis after in vivo inhibition of PP-1 and PP-2A. *Neurobiol Aging* **19**(1): 3-13

Arias C, Becerra-Garcia F, Arrieta I, Tapia R (1998) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus in vivo. *Exp Neurol* **153**(2): 242-254

Arias C, Sharma N, Davies P, Shafit-Zagardo B (1993) Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* **61**(2): 673-682

Bains JS, Shaw CA (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev* **25**(3): 335-358

Bennett PC, Moutsoulas P, Lawen A, Perini E, Ng KT (2003) Novel effects on memory observed following unilateral intracranial administration of okadaic acid, cyclosporin A, FK506 and [MeVal4]CyA. *Brain Res* **988**(1-2): 56-68

Billingsley ML, Kincaid RL (1997) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* **323** (Pt 3): 577-591

Bjerrum OJ, Heegaard, N.H.H. (1988) CRC handbook of immunoblotting of proteins. **vol. I**

Braak H, Braak E (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* **53**: 127-140

Brown AM, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* **55**(12): 1263-1271

Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* **108**: 347-352

Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, Tang H, Sowell RA, Spilman P, Fombonne J, Gorostiza O, Zhang J, Sultana R, Bredesen DE (2010) In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP. *Free Radic Biol Med* **48**(1): 136-144

Butterfield DA, Hensley K, Cole P, Subramaniam R, Aksenov M, Aksenova M, Bummer PM, Haley BE, Carney JM (1997) Oxidatively induced structural alteration of glutamine

synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* **68**(6): 2451-2457

Cagnoli CM, Kharlamov E, Atabay C, Uz T, Manev H (1996) Apoptosis induced in neuronal cultures by either the phosphatase inhibitor okadaic acid or the kinase inhibitor staurosporine is attenuated by isoquinolinesulfonamides H-7, H-8, and H-9. *J Mol Neurosci* **7**(1): 65-76

Calabrese V, Sultana R, Scapagnini G, Guagliano E, Sapienza M, Bella R, Kanski J, Pennisi G, Mancuso C, Stella AM, Butterfield DA (2006) Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* **8**(11-12): 1975-1986

Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* **82**(6): 1524-1532

Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**(6824): 37-40

Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, Mazzini GS, Souza DO, Portela LV (2010) Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation* **7**: 6

Chen LQ, Wei JS, Lei ZN, Zhang LM, Liu Y, Sun FY (2005) Induction of Bcl-2 and Bax was related to hyperphosphorylation of tau and neuronal death induced by okadaic acid in rat brain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **287**(2): 1236-1245

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* **101**(8): 2449-2476

Churcher I (2006) Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* **6**(6): 579-595

Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* **15**(3): 98-102

Colton CK, Kong Q, Lai L, Zhu MX, Seyb KI, Cuny GD, Xian J, Glicksman MA, Lin CL (2010) Identification of translational activators of glial glutamate transporter EAAT2 through cell-based high-throughput screening: an approach to prevent excitotoxicity. *J Biomol Screen* **15**(6): 653-662

Cordova FM, Rodrigues AL, Giacomelli MB, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR, Leal RB (2004) Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* **998**(1): 65-72

Craft JM, Watterson DM, Hirsch E, Van Eldik LJ (2005) Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. *J Neuroinflammation* **2**: 15

Crols R, Saerens J, Noppe M, Lowenthal A (1986) Increased GFAP levels in CSF as a marker of organicity in patients with Alzheimer's disease and other types of irreversible chronic organic brain syndrome. *J Neurol* **233**(3): 157-160

Cudkowicz ME, Sexton PM, Ellis T, Hayden DL, Gwilt PR, Whalen J, Brown RH, Jr. (1999) The pharmacokinetics and pharmaco-dynamics of Procysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **52**(7): 1492-1494

Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J (1994) The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* **44**(12): 2308-2314

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**(1): 1-105

de la Monte SM (2009) Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep* **42**(8): 475-481

de la Monte SM, Wands JR (2005) Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **7**(1): 45-61

Delacourte A, Defossez A (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* **76**(2-3): 173-186

Dickey RW, Bobzin SC, Faulkner DJ, Bencsath FA, Andrzejewski D (1990) Identification of okadaic acid from a Caribbean dinoflagellate, *Prorocentrum concavum*. *Toxicon* **28**(4): 371-377

Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**(7): 637-668

Donato R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* **60**(6): 540-551

Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* **1793**(6): 1008-1022

Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* **62**(6): 649-671

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* **267**(16): 4912-4916

Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **118**(1): 5-36

Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ (2006) The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **113**(11): 1685-1695

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**(9-10): 1439-1451

Fellin T, Carmignoto G (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol* **559**(Pt 1): 3-15

Feoli AM, Siqueira I, Almeida LM, Tramontina AC, Battu C, Wofchuk ST, Gottfried C, Perry ML, Goncalves CA (2006) Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *J Nutr* **136**(9): 2357-2361

Fernandes SP, Dringen R, Lawen A, Robinson SR (2010) Neurons express glutamine synthetase when deprived of glutamine or interaction with astrocytes. *J Neurochem* **114**(5): 1527-1536

Freemantle E, Vandal M, Tremblay-Mercier J, Tremblay S, Blachere JC, Begin ME, Brenna JT, Windust A, Cunnane SC (2006) Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **75**(3): 213-220

Fuller S, Steele M, Munch G (2010) Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease--do they neglect their neurosupportive roles? *Mutat Res* **690**(1-2): 40-49

Gee JR, Keller JN (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(6): 1145-1150

Gegelashvili G, Schousboe A (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull* **45**(3): 233-238

Gillessen T, Budd SL, Lipton SA (2002) Excitatory amino acid neurotoxicity. *Adv Exp Med Biol* **513**: 3-40

Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, Pepeu G, Casamenti F (2002) Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis* **11**(2): 257-274

Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* **32**(5): 619-631

Goncalves CA, Leite MC, Nardin P (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* **41**(10-11): 755-763

Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* **65**(2): 732-738

Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* **61**(3): 921-927

Gottfried C, Tramontina F, Goncalves D, Goncalves CA, Moriguchi E, Dias RD, Wofchuk ST, Souza DO (2002) Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev* **123**(10): 1333-1340

Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN (1997) Increased S100beta in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett* **235**(1-2): 5-8

Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* **65**(4): 391-426

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* **13**(2): 54-63

Haldar S, Jena N, Croce CM (1995) Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4507-4511

Halliwell B (2006a) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**(6): 1634-1658

Halliwell B (2006b) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **141**(2): 312-322

Halliwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1147-1150

Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**(2): 231-255

He J, Yamada K, Zou LB, Nabeshima T (2001) Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J Neural Transm* **108**(12): 1435-1443

Hensley K, Floyd RA, Zheng NY, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, Pye QN, Stewart CA, Geddes J, Markesbery WR, Patel E, Johnson GV, Bing G (1999) p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* **72**(5): 2053-2058

Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* **57**(4): 417-428

Hirrlinger J, Dringen R (2010) The cytosolic redox state of astrocytes: Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain Res Rev* **63**(1-2): 177-188

Ho DT, Shayan H, Murphy TH (1997) Okadaic acid induces hyperphosphorylation of tau independently of mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* **68**(1): 106-111

Hong HN, Yoon SY, Suh J, Lee JH, Kim D (2002) Differential activation of caspase-3 at two maturational stages during okadaic acid-induced rat neuronal death. *Neurosci Lett* **334**(1): 63-67

Hoyer S (2002) The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. *J Neural Transm* **109**(3): 341-360

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**(2-3): 198-210

Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1996) Molecular mechanism of Alzheimer's neurofibrillary degeneration and therapeutic intervention. *Ann N Y Acad Sci* **777**: 132-138

Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K (1993) Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* **325**(3): 167-172

Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, et al. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **159**(3): 871-877

Jacob CP, Koutsilieri E, Bartl J, Neuen-Jacob E, Arzberger T, Zander N, Ravid R, Roggendorf W, Riederer P, Grunblatt E (2007) Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **11**(1): 97-116

Jalbert JJ, Daiello LA, Lapane KL (2008) Dementia of the Alzheimer type. *Epidemiol Rev* **30**: 15-34

Jayaraj R, Gupta N, Rao PV (2009) Multiple signal transduction pathways in okadaic acid induced apoptosis in HeLa cells. *Toxicology* **256**(1-2): 118-127

Jellinger KA (2006) Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly--an update. *J Alzheimers Dis* **9**(3 Suppl): 61-70

Jellinger KA (2009) Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* **116**(9): 1111-1162

Jessen KR (2004) Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(10): 1861-1867

Johnson GV, Hartigan JA (1999) Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update. *J Alzheimers Dis* **1**(4-5): 329-351

Kamat PK, Tota S, Saxena G, Shukla R, Nath C (2010) Okadaic acid (ICV) induced memory impairment in rats: a suitable experimental model to test anti-dementia activity. *Brain Res* **1309**: 66-74

Kashon ML, Ross GW, O'Callaghan JP, Miller DB, Petrovitch H, Burchfiel CM, Sharp DS, Markesbery WR, Davis DG, Hardman J, Nelson J, White LR (2004) Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *J Alzheimers Dis* **6**(6): 595-604; discussion 673-581

Kato S, Gondo T, Hoshii Y, Takahashi M, Yamada M, Ishihara T (1998) Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque morphology and relationship between senile plaques and astrocytes. *Pathol Int* **48**(5): 332-340

Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1802**(4): 396-405

Kim K, Lee SG, Kegelman TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellicchia M, Sarkar D, Fisher PB (2010) Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol*

Kimelberg HK, Norenberg MD (1989) Astrocytes. *Sci Am* **260**(4): 66-72, 74, 76

Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(11): 4044-4048

Lackovic Z, Rebic V, Riederer PF (2009) Single intracerebroventricular injection of botulinum toxin type A produces slow onset and long-term memory impairment in rats. *J Neural Transm* **116**(10): 1273-1280

Le Prince G, Delaere P, Fages C, Duyckaerts C, Hauw JJ, Tardy M (1993) Alterations of glial fibrillary acidic protein mRNA level in the aging brain and in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurosci Lett* **151**(1): 71-73

Le Prince G, Delaere P, Fages C, Lefrancois T, Touret M, Salanon M, Tardy M (1995) Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochem Res* **20**(7): 859-862

Leal RB, Frizzo JK, Tramontina F, Fieuw-Makaroff S, Bobrovskaya L, Dunkley PR, Goncalves CA (2004) S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport* **15**(2): 317-320

Lebed YV, Orlovsky MA, Nikonenko AG, Ushakova GA, Skibo GG (2008) Early reaction of astroglial cells in rat hippocampus to streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci Lett* **444**(2): 181-185

Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* **169**(1): 93-99

Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E (1997) Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**(8): 901-911

Liem RK, Messing A (2009) Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* **119**(7): 1814-1824

Lim YW, Yoon SY, Choi JE, Kim SM, Lee HS, Choe H, Lee SC, Kim DH (2010) Maintained activity of glycogen synthase kinase-3beta despite of its phosphorylation at serine-9 in okadaic acid-induced neurodegenerative model. *Biochem Biophys Res Commun* **395**(2): 207-212

Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (2002) Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3beta. *FEBS Lett* **530**(1-3): 209-214

Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P (2010) Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5. *Aging Cell* **9**(1): 64-77

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275

Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* **2**(12): 679-689

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* **322**(4): 1111-1122

Markesbery WR (1999) The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Neurol* **56**(12): 1449-1452

Matias WG, Traore A, Bonini M, Sanni A, Creppy EE (1999) Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. *Hum Exp Toxicol* **18**(10): 634-639

McGeer EG, Singh EA, McGeer PL (1987) Sodium-dependent glutamate binding in senile dementia. *Neurobiol Aging* **8**(3): 219-223

Meeuwssen EJ, German P, Melis RJ, Adang EM, Goluke-Willemse GA, Krabbe PF, de Leest BJ, van Raak FH, Scholzel-Dorenbos CJ, Visser MC, Wolfs CA, Vliek S, Rikkert MG (2009) Cost-effectiveness of post-diagnosis treatment in dementia coordinated by Multidisciplinary Memory Clinics in comparison to treatment coordinated by general practitioners: an example of a pragmatic trial. *J Nutr Health Aging* **13**(3): 242-248

Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* **130**(4S Suppl): 1007S-1015S

Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* **93**(3): 421-443

Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* **21**(19): 7551-7560

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**(1): 47-60

Mrak RE, Griffinbc WS (2001) The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **22**(6): 915-922

Mudher AK, Perry VH (1998) Using okadaic acid as a tool for the in vivo induction of hyperphosphorylated tau. *Neuroscience* **85**(4): 1329-1332

Munoz L, Ammit AJ (2010) Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **58**(3): 561-568

- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**(5): 663-674
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**(10): 523-530
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* **3**(9): 748-755
- Noppe M, Crols R, Andries D, Lowenthal A (1986) Determination in human cerebrospinal fluid of glial fibrillary acidic protein, S-100 and myelin basic protein as indices of non-specific or specific central nervous tissue pathology. *Clin Chim Acta* **155**(2): 143-150
- Norenberg MD (1979) Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem* **27**(3): 756-762
- Norris CM, Kadish I, Blalock EM, Chen KC, Thibault V, Porter NM, Landfield PW, Kraner SD (2005) Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. *J Neurosci* **25**(18): 4649-4658
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**(7): 631-641
- O'Callaghan JP, Sriram K (2005) Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* **4**(3): 433-442
- Oliveira CS, Rigon AP, Leal RB, Rossi FM (2008) The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *Int J Dev Neurosci* **26**(3-4): 355-362
- Paxinos G (1997) The Rat Nervous System. *Academic Press San Diego, CA*

Pei JJ, Gong CX, An WL, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2003) Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **163**(3): 845-858

Pellerin L (2005) How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol* **32**(1): 59-72

Pellerin L, Magistretti PJ (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* **10**(1): 53-62

Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* **38**(3-4): 375-382

Pereira A, Jr., Furlan FA Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Prog Neurobiol* **92**(3): 405-420

Pereira A, Jr., Furlan FA (2010) Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Prog Neurobiol* **92**(3): 405-420

Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **39**(5-6): 409-413

Petzold A, Jenkins R, Watt HC, Green AJ, Thompson EJ, Keir G, Fox NC, Rossor MN (2003) Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **336**(3): 167-170

Picklo MJ, Montine TJ, Amarnath V, Neely MD (2002) Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**(3): 187-197

Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW (1995) Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **132**(2): 172-179

Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, Rothermundt M (2007) Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol* **184**(1-2): 214-222

Pope SA, Milton R, Heales SJ (2008) Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. *Neurochem Res* **33**(7): 1410-1418

Posser T, de Aguiar CB, Garcez RC, Rossi FM, Oliveira CS, Trentin AG, Neto VM, Leal RB (2007) Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch Toxicol* **81**(6): 407-414

Pratico D (2008) Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci* **1147**: 70-78

Ransom B, Behar T, Nedergaard M (2003) New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* **26**(10): 520-522

Rigon AP, Cordova FM, Oliveira CS, Posser T, Costa AP, Silva IG, Santos DA, Rossi FM, Rocha JB, Leal RB (2008) Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK. *Neurotoxicology* **29**(4): 727-734

Ritchie K, Lovestone S (2002) The dementias. *Lancet* **360**(9347): 1759-1766

Robinson SR (2000) Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochem Int* **36**(4-5): 471-482

Robinson SR (2001) Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **66**(5): 972-980

Rodnight R, Goncalves CA, Wofchuk ST, Leal R (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus

by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res* **30**(3): 325-338

Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, Quilfeldt JA, Achaval M, Goncalves CA (2009) Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis* **17**(1): 193-202

Ross GW, O'Callaghan JP, Sharp DS, Petrovitch H, Miller DB, Abbott RD, Nelson J, Launer LJ, Foley DJ, Burchfiel CM, Hardman J, White LR (2003) Quantification of regional glial fibrillary acidic protein levels in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* **107**(5): 318-323

Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* **60**(6): 614-632

Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P (2006) 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. *J Neurochem* **96**(4): 1005-1015

Savage MJ, Lin YG, Ciallella JR, Flood DG, Scott RW (2002) Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition. *J Neurosci* **22**(9): 3376-3385

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* **267**(16): 4904-4911

Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* **3**(1): 75-80

Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* **278**(3): 169-172

- Shih AY, Erb H, Sun X, Toda S, Kalivas PW, Murphy TH (2006) Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. *J Neurosci* **26**(41): 10514-10523
- Silvestrelli G, Lanari A, Parnetti L, Tomassoni D, Amenta F (2006) Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mech Ageing Dev* **127**(2): 148-157
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* **129**(4): 877-896
- Singh TJ, Grundke-Iqbal I, McDonald B, Iqbal K (1994) Comparison of the phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* **131**(2): 181-189
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10540-10543
- Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G (2000) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1502**(1): 139-144
- Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E (2008) Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* **45**(5): 667-678
- Stadtman ER (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* **928**: 22-38
- Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein HG (2011) S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med* **49**(3): 409-424

Suarez I, Bodega G, Fernandez B (2002) Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int* **41**(2-3): 123-142

Sultana R, Perluigi M, Newman SF, Pierce WM, Cini C, Coccia R, Butterfield DA (2010) Redox proteomic analysis of carbonylated brain proteins in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* **12**(3): 327-336

Sun A, Liu M, Nguyen XV, Bing G (2003) P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol* **183**(2): 394-405

Swarowsky A, Rodrigues L, Biasibetti R, Leite MC, de Oliveira LF, de Almeida LM, Gottfried C, Quillfeldt JA, Achaval M, Goncalves CA (2008) Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res* **190**(2): 206-211

Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**(3): 173-183

Thomazi AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wofchuk ST (2004) Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev* **125**(7): 475-481

Tian G, Kong Q, Lai L, Ray-Chaudhury A, Lin CL (2010) Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **113**(4): 978-989

Tian Q, Lin ZQ, Wang XC, Chen J, Wang Q, Gong CX, Wang JZ (2004) Injection of okadaic acid into the meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. *Neuroscience* **126**(2): 277-284

Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andreatza AC, Gottfried C, Kapczinski F, Goncalves CA (2007) Immunoassay for glial fibrillary acidic

protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* **162**(1-2): 282-286

Trojanowski JQ, Vandeerstichele H, Korecka M, Clark CM, Aisen PS, Petersen RC, Blennow K, Soares H, Simon A, Lewczuk P, Dean R, Siemers E, Potter WZ, Weiner MW, Jack CR, Jr., Jagust W, Toga AW, Lee VM, Shaw LM (2010) Update on the biomarker core of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative subjects. *Alzheimers Dement* **6**(3): 230-238

Tsukada S, Iino M, Takayasu Y, Shimamoto K, Ozawa S (2005) Effects of a novel glutamate transporter blocker, (2S, 3S)-3-[3-[4-(trifluoromethyl)benzoylamino]benzyloxy]aspartate (TFB-TBOA), on activities of hippocampal neurons. *Neuropharmacology* **48**(4): 479-491

Tunez I, Munoz Mdel C, Feijoo M, Munoz-Castaneda JR, Bujalance I, Valdelvira ME, Montilla Lopez P (2003) Protective melatonin effect on oxidative stress induced by okadaic acid into rat brain. *J Pineal Res* **34**(4): 265-268

Uchida T, Ishiguro K, Ohnuma J, Takamatsu M, Yonekura S, Imahori K (1994) Precursor of cdk5 activator, the 23 kDa subunit of tau protein kinase II: its sequence and developmental change in brain. *FEBS Lett* **355**(1): 35-40

Van Eldik LJ, Griffin WS (1994) S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta* **1223**(3): 398-403

Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* **21**(3-4): 97-108

Vicente E, Degerone D, Bohn L, Scornavaca F, Pimentel A, Leite MC, Swarowsky A, Rodrigues L, Nardin P, de Almeida LM, Gottfried C, Souza DO, Netto CA, Goncalves CA (2009) Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* **1251**: 204-212

Vicente E, Tramontina F, Leite MC, Nardin P, Silva M, Karkow AR, Adolf R, Lucion AB, Netto CA, Gottfried C, Goncalves CA (2007) S100B levels in the cerebrospinal fluid of rats are sex and anaesthetic dependent. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**(11): 1126-1130

Vogel J, Anand VS, Ludwig B, Nawoschik S, Dunlop J, Braithwaite SP (2009) The JNK pathway amplifies and drives subcellular changes in tau phosphorylation. *Neuropharmacology* **57**(5-6): 539-550

Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* **6**(8): 626-640

Waetzig V, Herdegen T (2004) Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci Lett* **361**(1-3): 64-67

Walton HS, Dodd PR (2007) Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **50**(7-8): 1052-1066

Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* **86**(4): 342-367

Weinstock M, Shoham S (2004) Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. *J Neural Transm* **111**(3): 347-366

Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ (2010) Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal* **12**(3): 393-404

Yan LJ, Forster MJ (2011) Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **879**(17-18): 1308-1315

Young JZ (1991) The concept of neuroglia. *Ann N Y Acad Sci* **633**: 1-18

Zhang Z, Simpkins JW (2010) An okadaic acid-induced model of tauopathy and cognitive deficiency. *Brain Res* **1359**: 233-246

Zhao W, Bennett P, Sedman GL, Ng KT (1995) The impairment of long-term memory formation by the phosphatase inhibitor okadaic acid. *Brain Res Bull* **36**(6): 557-561

Zhou XW, Gustafsson JA, Tanila H, Bjorkdahl C, Liu R, Winblad B, Pei JJ (2008) Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A. *Neurobiol Dis* **31**(3): 386-394

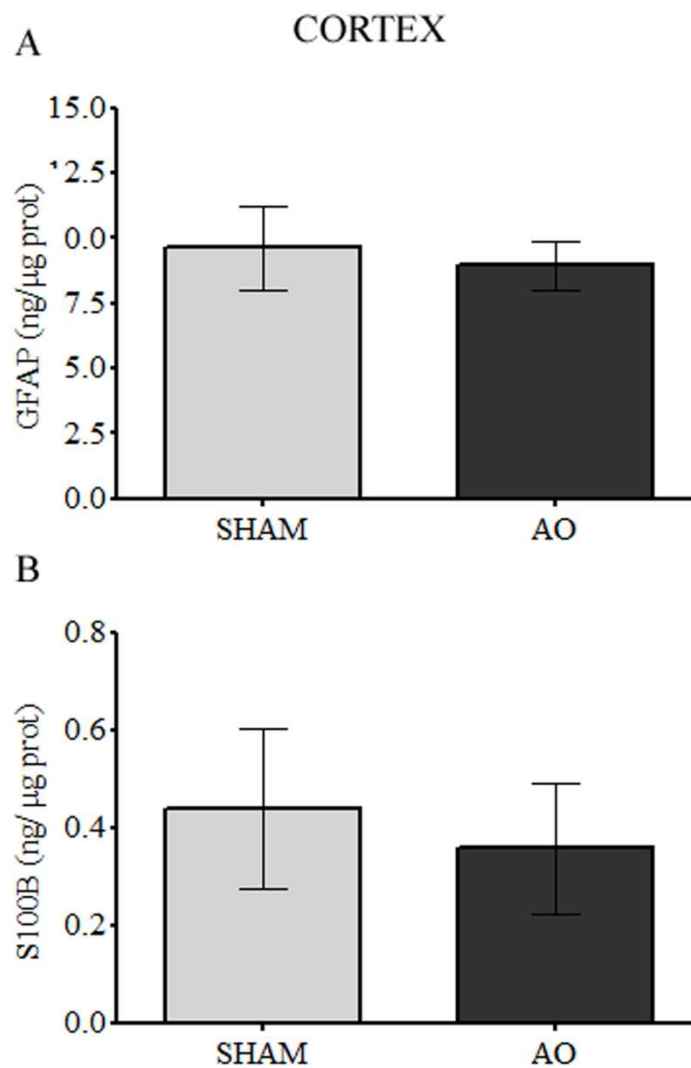
Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Boux H, Smith MA (2001) Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **76**(2): 435-441

Zimmer DB, Van Eldik LJ (1987) Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins. *Am J Physiol* **252**(3 Pt 1): C285-289

ANEXOS

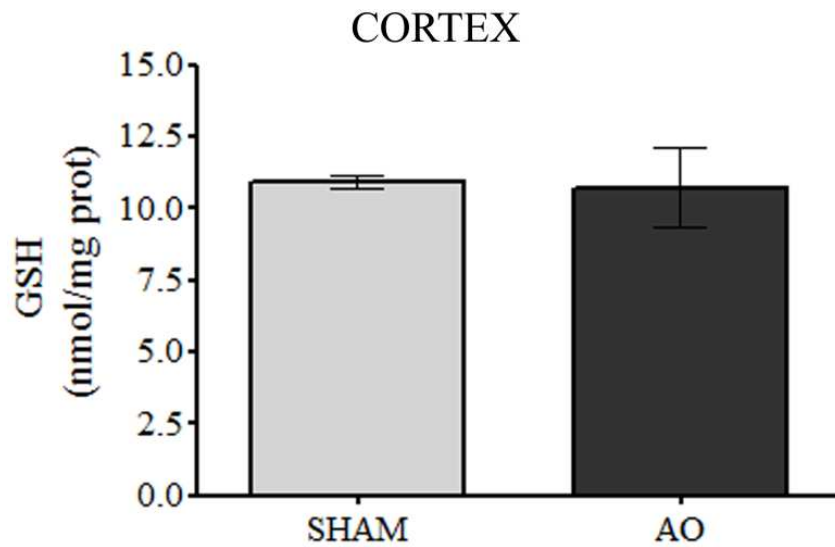
Resultados não publicados na dissertação

- GFAP e S100B no córtex.



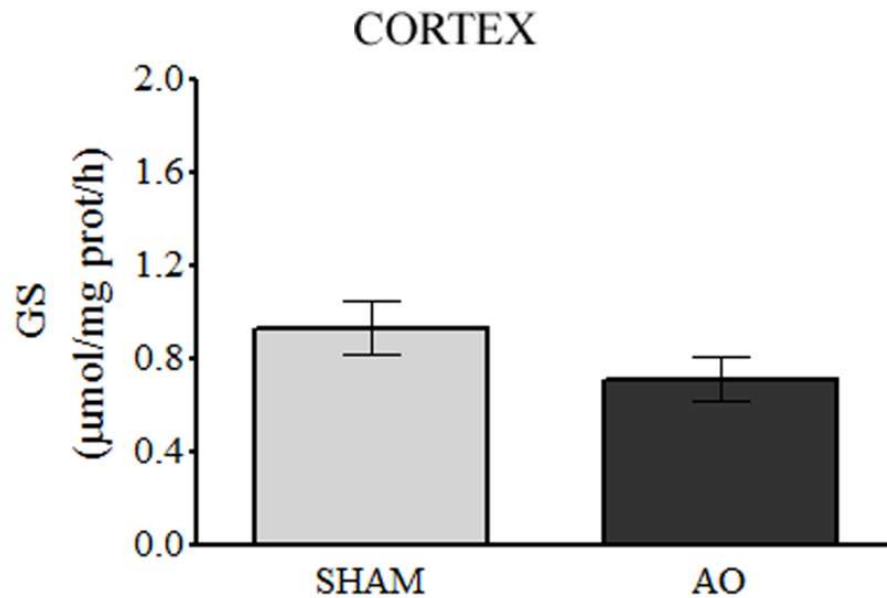
Imunoconteúdo de GFAP e S100B em córtex de ratos submetidos à injeção intrahipocampal de ácido ocadáico (AO) (100 ng). Córtex foi dissecado e o conteúdo de GFAP (**A**) e S100B (**B**) foi mensurado por ELISA. Os valores representam a média \pm erro padrão (N = 10) * Diferenças significativas a partir do controle (*Student's test*, $p < 0.05$).

- Glutathione (GSH reduced) in cortex.



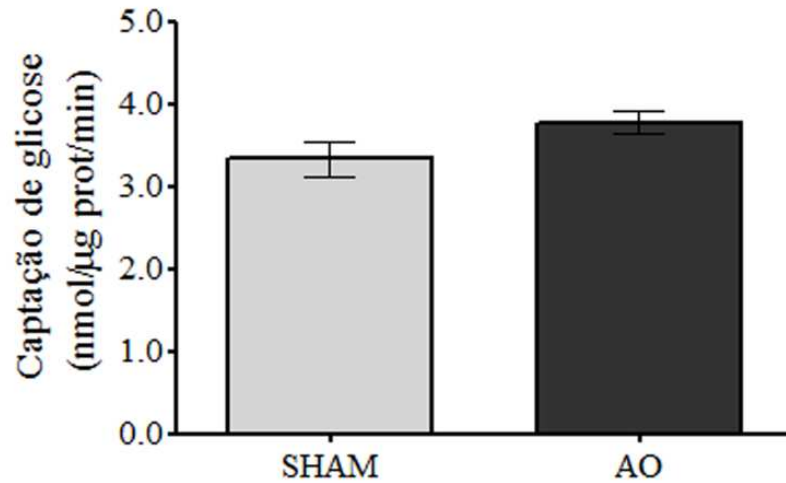
Conteúdo de glutathione (GSH reduced) in cortex of rats subjected to intrahippocampal injection of oic acid (AO) (100 ng). Cortex was dissected and homogenized to measure glutathione (only reduced form detected). The values represent the mean \pm standard error (N = 8) * Significant differences from control (*Student's test*, $p < 0.05$).

- Glutamina sintetase (GS) no córtex.



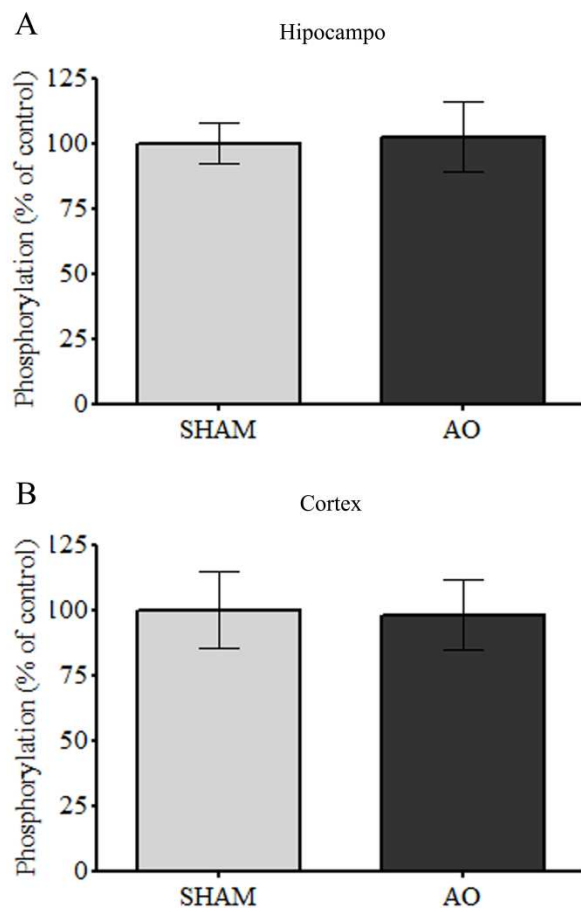
Atividade da glutamina sintetase (GS) em córtex de ratos submetidos à injeção intrahipocampal de ácido ocaídico (AO) (100 ng). Córtex foi dissecado e o homogeneizada para mensurar a atividade de glutamina sintetase. Os valores representam a média \pm erro padrão (N = 8) * Diferenças significativas a partir do controle (*Student's test*, $p < 0.05$).

- Captação de glicose no hipocampo.



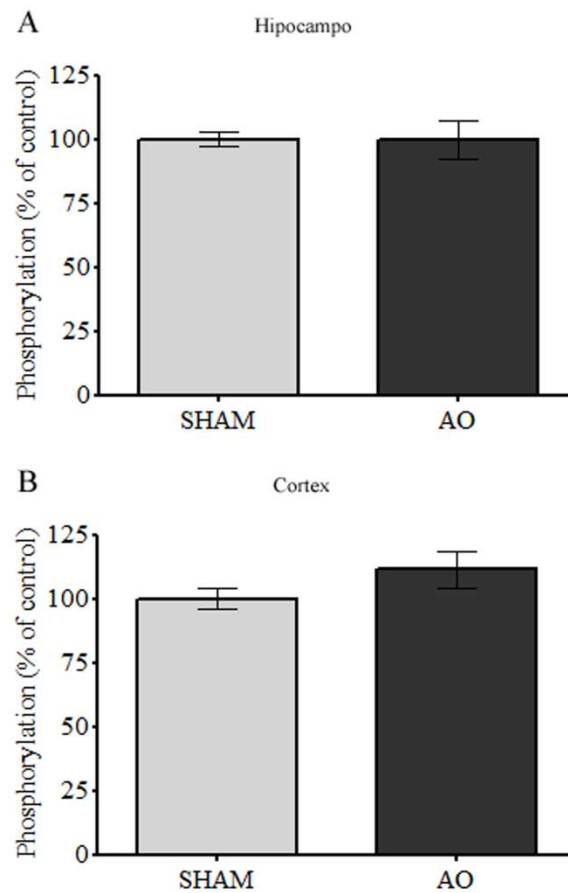
Captação de glicose em hipocampo de ratos submetidos à injeção intrahipocampal de ácido oadáico (AO) (100 ng). Hipocampo foi dissecado e fatiado a 0,3 mm para mensurar a captação de glicose. Os valores representam a média \pm erro padrão (N = 8) * Diferenças significativas a partir do controle (*Student's test*, $p < 0.05$).

- Fosforilação de GSK3 β no hipocampo e córtex.



Fosforilação da GSK 3 β (Ser 9) em hipocampo e córtex de ratos submetidos à injeção intrahipocampal de ácido ocadáico (AO) (100 ng). Hipocampo e córtex foram dissecados e fatiado a 0,3 mm, as fatias homogeneizadas em *SDS stop solution* e as proteínas separadas por eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose, avaliadas por *western blotting* para a fosforilação de GSK 3 β . A revelação foi realizada por quimioluminescência. As bandas foram quantificadas e os resultados mostrados representam a porcentagem do controle. Os valores representam a média \pm erro padrão (N = 8). * Diferenças significativas a partir do controle (*Student's test*, $p < 0.05$).

- Fosforilação de AKT no hipocampo e córtex.



Fosforilação da AKT em hipocampo e córtex de ratos submetidos à injeção intrahipocampal de ácido ocadáico (AO) (100 ng). Hipocampo e córtex foram dissecados e fatiado a 0,3 mm, as fatias homogeneizadas em *SDS stop solution* e as proteínas separadas por eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose, avaliadas por *western blotting* para a fosforilação de AKT. A revelação foi realizada por quimioluminescência. As bandas foram quantificadas e os resultados mostrados representam a porcentagem do controle. Os valores representam a média \pm erro padrão (N = 8). * Diferenças significativas a partir do controle (*Student's test*, $p < 0.05$).