

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA**

Clarissa Branco Haas

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E FARMACOLÓGICOS
DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA
INTRACEREBROVENTRICULAR EM RATOS
JOVENS E VELHOS.**

Porto Alegre

2010
Clarissa Branco Haas

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E FARMACOLÓGICOS
DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA
INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV) EM RATOS
JOVENS E VELHOS.**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Farmacêutico pelo
Curso de Farmácia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.**

Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela
Orientador
MSc. Alexandre Pastoris Muller
Co-orientador

Porto Alegre

2010

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Nara e João, pelo apoio em todas as etapas de minha vida nessa caminhada até o término da graduação, sem eles, certamente, nada disso seria possível.

Gostaria de agradecer, sinceramente, ao meu orientador Luis Valmor, por sempre acreditar no meu trabalho e apoiar as minhas idéias, em especial orientando esse trabalho de conclusão de curso.

Agradeço, ao meu co-orientador, Alexandre, por todas as lições com ele aprendidas sobre neurociências e bioquímica e também por orientar o presente trabalho.

Agradeço a minha Irmã, Renata, pelo companheirismo ao longo de toda graduação.

Gostaria de agradecer, também aos meus outros familiares, Wilma, Renata e Virgínia por acreditarem em mim durante toda a graduação.

Agradeço aos amigos do laboratório, Eduardo Zimmer, Eduardo Kalinine e Jussânia Gnoato, pela amizade e também pela ajuda para que esse trabalho se realizasse.

Agradeço aos demais amigos pela força durante toda a trajetória até a realização do trabalho de conclusão.

Este trabalho foi elaborado de acordo com as normas da revista Brain Research.

Sumário

Manuscrito

Título do trabalho _____	6
Resumo _____	7
Introdução _____	9
Resultados _____	12
Discussão _____	15
Materiais e métodos _____	18
Referências _____	22
Legendas das figuras _____	27
Figuras _____	29
Anexo _____	35

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E FARMACOLÓGICOS
DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA INTRACEREBROVENTRICULAR EM
RATOS JOVENS E VELHOS.

Clarissa B. Haas^a, Eduardo Kalinine^a, Eduardo Zimmer^a, Diogo O. Souza^a, Alexandre

P. Muller^{a*}, Luis V. Portela^a

- a. Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica. Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

Email: alexandrep.muller@gmail.com

Telephone: 55 51 33085557

Fax: 55 51 33085544

Resumo

O envelhecimento está associado a alterações no Sistema Nervoso Central (SNC). Processos de apoptose e neurogênese têm sido elementos chaves no estudo do envelhecimento. Pouco se sabe sobre os efeitos da insulina em relação a esses e outros processos cerebrais. Estudos demonstram que a insulina exerce funções modulatórias e neurotróficas no cérebro e a diminuição de suas ações e sinalização cerebral está presente no processo de envelhecimento e têm sido associada ao surgimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e outras demências. Nesse estudo foram utilizados ratos Wistar jovens (4-5 meses de idade, n=13) e velhos (22-26 meses de idade, n=11), tratados com 20 mU de insulina ou salina intracerebroventricular (icv) uma vez ao dia durante cinco dias. Foram avaliadas a locomoção espontânea (campo aberto) e a memória espacial (labirinto aquático de Morris). Além disso, foram investigados os efeitos farmacológicos da insulina, avaliando alterações neuronais, gliais e nucleares por imunohistoquímica em sub-regiões hipocâmpais (CA1, CA3 e Giro Denteado), e o imunocontéudo da proteína poly ADPribose polymerase (PARP) por Western Blotting em homogeneizados de hipocampo. Os resultados demonstram que o tratamento com insulina icv melhorou a memória espacial somente nos animais jovens. O envelhecimento diminuiu a intensidade de fluorescência do marcador neuronal (NeuN) nas três sub – regiões do hipocampo analisadas, CA1, CA3 e GD e mostrou aumentar a fluorescência do marcador de glia (GFAP) na sub-região CA3. O tratamento com insulina icv foi capaz de aumentar a fluorescência de NeuN em ratos jovens e velhos nas sub-regiões CA1 e GD do hipocampo. O imunocontéudo da proteína PARP foi diminuído, em ratos velhos, na presença de

insulina, indicando uma provável inibição de morte neuronal por apoptose. Assim, os dados sugerem uma diminuição das ações da insulina em algumas sub-regiões hipocâmpais de animais velhos e isto se reflete na perda do efeito benéfico na cognição ocorrida em animais jovens. Essa diminuição tem sido proposta como uma resistência cerebral à insulina e poderia contribuir para o desenvolvimento de doenças cerebrais associadas ao envelhecimento.

Palavras – chave: Envelhecimento, hipocampo, poly ADP-ribose polymerase (PARP), insulina.

1. Introdução

Com o aumento da expectativa de vida da população, o envelhecimento cerebral e a sua estreita associação com o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas como, por exemplo, as doenças de Alzheimer (DA) e Parkinson, têm sido alvo de investigações nos últimos anos. Enquanto em 1990 a expectativa de vida alcançava somente 47 anos de idade em países desenvolvidos, hoje as pessoas vivem em média até os 77 anos de idade (Driscoll et al., 2008; Fried, 2000). Apesar do imenso progresso científico neste campo durante a última década, os mecanismos celulares e moleculares cerebrais responsáveis pelos prejuízos cognitivos, normal e patológico, associados ao envelhecimento ainda não foram totalmente estabelecidos. Em 1931 foram caracterizadas as alterações normais relacionadas ao envelhecimento, como por exemplo, declínio na memória, alterações na visão, perda de audição progressiva, diminuição da coordenação motora e da força muscular. Diferentemente das alterações normais relacionadas ao envelhecimento, doenças degenerativas são caracterizadas por uma progressiva e lenta perda neuronal específica, levando a déficits neurológicos substanciais (Ziv and Melamed, 2010). Resultados recentes de estudos epidemiológicos sugerem que a obesidade e o Diabetes Mellitus (DM) são importantes fatores de risco para o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas e suas comorbidades (Ott et al., 1999), podendo aumentar o risco de desenvolvimento de DA (McNay et al., 2010).

O cérebro, já foi descrito como um órgão insensível à insulina, no entanto, este pressuposto é atualmente aceito como equivocado uma vez que já foi demonstrado que a insulina exerce no cérebro funções que incluem a regulação do metabolismo, modulação de

sistemas de neurotransmissão gabaérgico e glutamatérgico e efeitos tróficos sobre neurônios e astrócitos. Estes efeitos são importantes para os processos de aprendizado e memória e para o desenvolvimento e sobrevivência de células neurais (Park, 2001; Craft et al., 2004). O receptor de insulina (IR) está presente em grandes concentrações em todas as regiões do cérebro, mas principalmente nos neurônios de áreas relacionadas com aprendizado e memória como hipocampo, córtex cerebral e amígdala. A insulina ligada aos seus receptores, nos neurônios, é capaz de desencadear cascatas de sinalização envolvidas na regulação da sobrevivência e morte neuronal, bem como facilitar a plasticidade sináptica. Já foi descrito que a insulina é capaz de inibir a apoptose em cultura de neurônios e que essa resposta é dependente da presença de IR e de receptores de IGF-I (van der Heide et al., 2006), entretanto a relação da sinalização de insulina com a cascata de apoptose ainda não havia sido testada utilizando um modelo in vivo com administração icv de insulina.

O nosso grupo de pesquisa já demonstrou que o exercício físico é capaz de aumentar a sensibilidade do hipocampo de camundongos à insulina, de aumentar a utilização de glicose nessa região cerebral e aumentar a captação de glutamato no hipocampo. Essas alterações foram acompanhadas de uma melhora da performance, de camundongos exercitados, no teste de labirinto aquático de Morris (Muller et al., 2010). No presente estudo, utilizamos o mesmo modelo de infusão de insulina icv, entretanto avaliando o impacto desse tratamento no cérebro de animais velhos.

Assim, os mecanismos desencadeados pela ação da insulina sobre os seus receptores cerebrais em condições fisiológicas ou patológicas tem sido alvo de vários estudos clínicos e experimentais. A redução do transporte de insulina em toda a barreira sangue-cérebro e a diminuição da sinalização cerebral, têm sido propostas como uma forma de resistência cerebral à insulina (Steen et al., 2005; Ott et al., 1999). Neste contexto, o prejuízo na

sinalização de insulina pode potencialmente causar a morte de neurônios do hipocampo, o que parece estar implicado nas alterações morfológicas e na perda das funções cognitivas associadas a essa região cerebral. Por outro lado, evidências sugerem que apesar das semelhanças celulares entre as sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo, elas diferem significativamente em aspectos relacionados à sua fisiologia e principalmente com relação à sua vulnerabilidade à morte celular (Jackson et al., 2009).

Em geral pode se dizer que em humanos o tamanho do hipocampo diminui ao longo do envelhecimento normal, mas essa diminuição é mais acentuada na Doença de Alzheimer (Whitwell et al., 2005). Embora os dois tipos de diabetes (I e II) causem prejuízos cognitivos, em jovens, o impacto na qualidade de vida é pequeno. Entretanto em pacientes diabéticos a partir de 65 anos esse impacto é, realmente, muito maior. Ratos velhos (24 meses) diabéticos apresentaram piora na performance no labirinto aquático de Morris, quando comparados a ratos jovens diabéticos, sugerindo uma interação entre envelhecimento e a disfunção cerebral causada pela DM (Gispén et al., 2000). A resistência cerebral à insulina foi descrita como Diabete Mellitus tipo III por De La Monte (de la Monte et al., 2005), baseado no fato de que os pacientes com DA apresentam comprometimento nas vias de sinalização de insulina e IGF-I no hipocampo e no córtex, áreas envolvidas no aprendizado e na memória. Além disso, o envelhecimento aumenta a resistência periférica à insulina, entretanto, ainda não está claro se a resistência cerebral e periférica acontece concomitantemente.

Os processos de apoptose e neurogênese têm sido elementos chaves no estudo do envelhecimento e de doenças neurodegenerativas. A regulação da morte celular é determinante na longevidade do sistema nervoso adulto, e o papel da apoptose tem sido considerado decisivo para o surgimento de doenças degenerativas, em estudos pós mortem

e em modelos animais (Ziv et al., 2010). A proteína poly ADPribose polymerase (PARP) atua no reparo do DNA, mas também participa da cascata de sinalização de apoptose, uma vez que interage com fatores de transcrição chaves na regulação da morte/sobrevivência celular e da inflamação, como o p53 ou NF- κ B (Songin et al., 2007).

Considerando que a insulina exerce efeitos neuroprotetores ao cérebro e que no envelhecimento ocorre uma importante perda de células neurais associada a prejuízos cognitivos, neste estudo pretendemos utilizar uma abordagem farmacológica com administração de insulina intracerebroventricular para avaliar efeitos comportamentais e neuroquímicos desse tratamento em ratos jovens e velhos.

2. Resultados

2.1 Envelhecimento diminuiu a locomoção de ratos velhos

Para avaliar a locomoção dos animais foi realizado o teste de campo aberto dois dias após o tratamento icv com insulina. O envelhecimento diminuiu a atividade locomotora dos animais velhos e o tratamento com insulina não afetou esse parâmetro (Fig. 1, $p < 0.05$).

2.2 Insulina icv melhorou a memória espacial de ratos jovens

Para avaliar a memória espacial dos animais foi realizada a tarefa do labirinto aquático de Morris. Após o terceiro dia de treinamento (fase de aquisição) os animais jovens apresentaram diminuição na latência para encontrar a plataforma em comparação com outros grupos. Este padrão se manteve até o último dia da tarefa (5 dias de treinamento

- fase de aquisição). Os animais jovens que receberam insulina icv ficaram mais tempo no quadrante alvo durante o teste (fase de retenção) realizado no sexto dia sem a plataforma. Os Animais velhos, com e sem tratamento, não apresentaram diferenças em comparação aos jovens na fase de aquisição e retenção. Assim, o tratamento icv com insulina não afetou o desempenho no labirinto aquático dos animais velhos (Fig.2).

2.3 O tratamento com insulina icv alterou a densidade celular de neurônios e astrócitos em diferentes sub-regiões do hipocampo

Para avaliar se o tratamento icv com insulina afetou a densidade de neurônios, astrócitos e núcleos nas sub-regiões CA1, CA3 e Giro Denteado (GD) do hipocampo de ratos jovens e velhos foi utilizada a técnica de imunohistoquímica.

Efeitos na sub-região CA1

Em ratos velhos a fluorescência de NeuN, um marcador neuronal, mostrou-se diminuída, em comparação aos ratos jovens, indicando que no envelhecimento houve uma diminuição da densidade celular de neurônios na sub-região CA1 do hipocampo (jovem > velho * $p < 0.05$). Entretanto o tratamento icv com insulina aumentou a fluorescência de NeuN tanto em ratos jovens quanto em velhos, quando comparados com os seus respectivos grupos controles (jovem insulina > jovem controle; velho insulina > velho controle; * $p < 0.05$). Deste modo, a insulina icv foi capaz de alterar a fluorescência de NeuN em ratos velhos para níveis similares aos de jovens controles (velho insulina = jovem controle; * $p < 0.05$). O tratamento não alterou a densidade de células positivas para GFAP (marcador

de astrócitos) em nenhum dos quatro grupos analisados. A marcação com DAPI (marcador de núcleos celulares em geral) foi aumentada em ratos jovens e velhos tratados com insulina (jovem insulina>jovem controle; velho insulina>velho; *p<0.05). Os Ratos velhos apresentaram uma diminuição na densidade de núcleos em comparação aos ratos jovens (jovem controle>velho controle; *p<0.05). Esses resultados indicam uma diminuição da densidade de núcleos na sub-região CA1 de animais velhos controles, que quando tratados com insulina icv 20 mU apresentaram um aumento nesse parâmetro (Figura 4).

Efeitos na sub-região CA3

O envelhecimento diminuiu a fluorescência de NeuN (neurônios) e aumentou a fluorescência das células gliais (GFAP), independentemente do tratamento com insulina icv (jovem controle e jovem insulina>velho controle e velho insulina; *p<0,05). O tratamento icv com insulina não apresentou efeito sobre a fluorescência dos neurônios, astrócitos e núcleos (DAPI), dessa sub-região em animais jovens e velhos (figura 5).

Efeitos na sub-região Giro Denteado (GD)

O envelhecimento, independentemente do tratamento, causou uma diminuição do marcador NeuN (neurônios), como nas outras sub-regiões hipocâmpais analisadas, CA1 e CA3. O tratamento com insulina icv alterou a fluorescência desse marcador apenas em animais velhos (velho controle < velho insulina, jovem controle = jovem insulina; *p<0,05), sendo capaz de causar um substancial aumento da densidade neuronal nessa sub-região em ratos velhos. Em ratos jovens, o tratamento com insulina não afetou a

fluorescência de NeuN. Na sub-região GD, tanto em ratos jovens como em velhos, os marcadores GFAP e DAPI não foram alterados na presença de insulina (figura 6).

2.4 O tratamento com insulina icv alterou o imunoconteúdo de PARP

Avaliamos o imunoconteúdo da proteína PARP, como um marcador de morte neuronal. Essa proteína atua em mecanismos de sinalização envolvidos na morte por apoptose. O envelhecimento provocou um aumento no imunoconteúdo de PARP no hipocampo. O tratamento com insulina icv foi capaz de diminuir o imunoconteúdo dessa proteína em animais velhos (jovem insulina e velho controle > velho insulina, * $p < 0.05$) a níveis semelhantes a animais jovens (jovem controle = velho insulina, $p < 0.05$). (figura 7)

3. Discussão

Os dados do presente trabalho demonstram que o tratamento cerebral com insulina melhorou o aprendizado e a memória espacial dos ratos jovens quando comparados com os ratos velhos. A locomoção espontânea mostrou-se diminuída em ratos velhos comparados com ratos jovens. Nossos resultados também sugerem que a insulina exerce um importante papel neurotrófico no hipocampo de ratos jovens e velhos. O tratamento icv com insulina aumentou a densidade de neurônios na sub-região CA1 do hipocampo tanto em ratos jovens como em velhos. Por outro lado, a insulina não aumentou a densidade celular de neurônios na sub-região CA3 do hipocampo, mas foi capaz de aumentar a densidade celular de neurônios na sub-região GD de ratos velhos. Houve diminuição do imunoconteúdo da

proteína PARP em animais velhos tratados com insulina icv, sugerindo uma inibição da morte neuronal nesses animais.

O processo de envelhecimento modifica múltiplos sistemas biológicos, sendo o tecido cerebral particularmente afetado pela degeneração associada à idade. Algumas alterações morfológicas cerebrais estão intimamente relacionadas com o envelhecimento, tais como atrofia dos neurônios das regiões do córtex cerebral e do hipocampo, diminuição do número de sinapses e de alguns tipos de receptores, acúmulo de produtos de oxidação e aumento da astrogliose (Haug et al., 1984; Siegel et al., eds 1999; Morrison & Hof, 1997). Nossos resultados demonstram algumas alterações normais que ocorrem durante o processo de envelhecimento cerebral. Pelo método de imunohistoquímica foi possível visualizar a diminuição da densidade neuronal, no hipocampo, causada pelo envelhecimento. Além disso foi observado um aumento na reatividade glial, na sub-região CA3 do hipocampo de ratos velhos.

O hipocampo exerce um papel importante na memória espacial de roedores (Moosavi et al., 2006). As sinapses no hipocampo ocorrem primeiramente nas células granulares do GD e seguem através das fibras para as células piramidais da sub-região CA3 e finalmente para a sub-região CA1, que está interligada ao córtex. Sub-regiões do hipocampo possuem diferentes funções nos processos de aprendizado e memória (George Paxinos, 2004). Ratos lesionados na sub-região CA3 apresentam desempenho comprometido no labirinto aquático de Morris, quando comparados com ratos que tiveram a lesão na sub-região CA1. No entanto, a sub-região CA3 afeta a aquisição e a codificação da informação espacial na memória de curto prazo, com duração de segundos e minutos (Kesner, 2007). Tem sido relatado que ratos velhos possuem seu desempenho, freqüentemente, prejudicado na tarefa do labirinto aquático de Morris (Rosenzweig &

Barnes, 2003) e o tratamento icv com insulina é reconhecido como facilitador de aprendizagem em ratos jovens (Park, et al., 2000; Moosavi, et al., 2007; Chiu, et al., 2008), porém, o efeito em ratos velhos ainda não havia sido testado no protocolo do labirinto aquático de Morris, tampouco em relação à densidade de células neurais no hipocampo e quanto ao imunoconteúdo de um marcador de apoptose. Neste, trabalho o envelhecimento diminuiu a densidade de células neurais em todas as regiões do hipocampo. No entanto, os neurônios da sub-região CA1 e GD parecem ser mais sensíveis aos efeitos neurotróficos do tratamento com insulina icv, quando comparados aos neurônios da sub-região CA3. Os dados demonstram, ainda, que a insulina melhora a memória espacial em ratos jovens, e essa melhora pode estar relacionada com o aumento da densidade celular de neurônios nas sub-regiões CA1 e GD do hipocampo causadas pela administração de insulina icv.

A morte neuronal é um evento comum na fisiologia do envelhecimento cerebral e nas doenças degenerativas. Importaneamente, diferente de outros tecidos, o cérebro adulto apresenta a função de proliferação celular extremamente limitada. Alguns autores consideram a PARP como “guardiã do genoma”, assim a sua importância no processo de envelhecimento tem sido amplamente discutida (Strosznajder, 2005) . A insulina foi capaz de diminuir consideravelmente o imunoconteúdo de PARP em animais velhos, o que poderia estar associado com o aumento da densidade neuronal nas sub – regiões CA1 e GD do hipocampo de ratos velhos, uma vez que a apoptose estaria diminuída.

Já foi demonstrado que a atividade de PARP está aumentada no hipocampo de ratos Wistar velhos (24 meses), e que isso estaria correlacionado a um aumento de dano no DNA desses animais. A utilização de um inibidor de PARP (3-aminobenzamide) em ratos jovens e velhos mostrou que essa proteína tem função regulatória sobre GSK3- β , uma proteína

também modulada pela cascata de sinalização de insulina no cérebro (Strosznajder et al., 2000; Strosznajder et al., 2005; Songin et al., 2007).

É possível sugerir que a sinalização via insulina promove a inibição da apoptose no hipocampo. Entretanto o aumento da densidade celular neuronal, promovido pela insulina, parece não refletir em uma melhora na memória espacial dos animais velhos. Isso poderia indicar que o envelhecimento não leva apenas a neurodegeneração, mas também causa prejuízos nas cascatas de sinalização da insulina em seus receptores neuronais no hipocampo com um importante impacto nos processos de aprendizado e memória. Assim, a insulina e seus receptores parecem ter uma importante implicação como alternativa farmacológica na terapia de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento.

4. Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar (n = 24) alojados em gaiolas de poliuretano numa sala de temperatura controlada em 12 horas claro/12 horas ciclo escuro, com livre acesso à comida e água. Os animais jovens que tinham 4 - 5 meses de idade e os velhos 24 - 26 meses de idade foram divididos em 4 grupos: jovem salina (n=8), jovem insulina (n=6), velho salina (n = 12) e velho insulina (n = 8).

Procedimento cirúrgico e tratamento icv

Os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal (ip) de ketamina (100 mg / kg de peso corporal) e xilazina (10 mg / kg de peso corporal). Uma cânula guia foi unilateralmente colocada (27 de calibre 9 mm) nas seguintes coordenadas cerebrais: 0,9

mm posterior ao bregma, 1,5 mm à direita da linha média e 1,0 mm acima do ventrículo cerebral lateral direito. A cânula foi implantada ventral (2,6 mm para a superfície superior do crânio) através de cirurgia. Um dia após a cirurgia os ratos já exibiam ingestão normal de alimentos e consumo de água, bem como a locomoção espontânea, e foram assim considerados aptos para experimentos in vivo. Os animais receberam 5uL de insulina (Lilly, Humulin) ou veículo (solução salina 0,9%), durante cinco minutos (1uL/min), icv, na dose total de 20 mU uma vez ao dia, durante cinco dias.

Atividade locomotora

Para avaliação da atividade locomotora foi realizada a tarefa de Campo Aberto sempre das 9:00 às 16:00h. Para isso, dois dias após o término do tratamento icv com insulina, os animais foram distribuídos aleatoriamente e individualmente em quatro caixas de madeira (50 x 50 x 50 cm). Vídeos foram obtidos e analisados pelo software N Maze para avaliar a atividade locomotora durante 5 min.

Memória espacial

Para avaliação da memória espacial dos animais foi realizado a tarefa do Labirinto Aquático de Morris após três dias do fim do tratamento icv com insulina. Neste protocolo, o hipocampo exerce um papel crucial para que a tarefa seja executada. O equipamento utilizado foi uma piscina circular preta (200 cm de diâmetro) com água numa temperatura de 21 ± 1 ° C. No início de cada sessão os ratos foram colocados nos quatro quadrantes da piscina, por cinco dias consecutivos (fase de aquisição). Após a largada em cada quadrante

os ratos devem nadar livremente durante 60 s em busca de uma plataforma escondida. Cada teste foi separado por 12 min de descanso. Se o animal não conseguia encontrar a plataforma em 60 s, ele era colocado delicadamente sobre a plataforma e deixado em repouso por 20 s. Durante o treinamento, os ratos aprendem a escapar da água por encontrar uma plataforma escondida rígida preta submersa cerca de 1 cm abaixo da superfície da água em um local fixo. No sexto dia a plataforma é retirada e o tempo em que o animal permanece no quadrante alvo (local onde se encontrava a plataforma escondida) corresponde ao aprendizado adquirido no período de treinamento. O labirinto era localizado em uma sala bem iluminada branca com vários estímulos visuais fixados nas paredes para fornecer pistas espaciais. A latência de escape durante cada experimento foi medido como um indicador de aprendizagem. Um teste foi efetuado sem a plataforma, e o tempo gasto no quadrante alvo foi avaliado como um indicador de retenção da memória. Vídeos foram obtidos e analisados pelo software N Maze.

Imunohistoquímica

Para as análises imunohistoquímicas, os animais (4-6 ratos por grupo) foram sacrificados e os hemisférios esquerdos foram pós-fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 24 horas e, em seguida, em uma solução de sacarose de 30% a 4 ° C. Secções de 50 µm foram obtidas utilizando um Vibratomo (Leica, Alemanha) e estocados em tampão PBS 0,2 M. Uma fatia em 8 séries aleatória foram coletadas para análise. Uma dupla marcação imuno-histoquímica (NeuN e GFAP) foi realizada para identificar neurônios e células gliais. Núcleos em geral foram observados com a coloração DAPI. As secções foram incubadas por 48 horas a 4 °C com anticorpo

policlonal anti-GFAP (coelho) (Dako, Reino Unido, 1:500) e anti-NeuN (coelho) (Chemicon, 1:500) em PBS-Tx contendo 2% de BSA. Depois de ser lavado várias vezes com PBS, as secções foram incubadas com anticorpos conjugados anti-alexa 594nm (coelho) e anti-alexa 488nm (camundongo) por 24 horas a 4 °C. Posteriormente as fatias foram coradas com DAPI (0,0001% - Milipore) para marcação dos núcleos. Após 24 horas as secções foram colocadas sobre lâminas com o reagente FluorSave (Calbiochem). Para determinar a densidade de fluorescência, os cortes foram fotografados com um sistema de microscopia de fluorescência Confocal (Olympus FV1000) e analisados utilizando o software Image J.

Western Blotting

Os homogeneizados de hipocampo foram preparados utilizando 25 mM Hepes (pH 7,4) e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) contendo coquetel de inibidores de protease e fosfatase. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000g, por cinco minutos, os sobrenadantes foram coletados e a quantidade de proteína foi quantificada de acordo com Peterson GL, 1977. As amostras foram normalizadas a 2 µg proteína/µL de tampão de amostra (4% SDS, 2,1mM EDTA, 50mM Tris e 5% β- mercaptoetanol) e posteriormente submetidas a eletroforese (20 – 60 µg proteína/poço) em gel de poliacrilamida de 10 - 16% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Ligações não específicas foram bloqueadas com tampão Tween–Tris (TTBS, 100 mM Tris–HCl, pH 7.5) contendo 5 % de albumina bovina por 2 h. As membranas foram incubadas por 24h a 4°C com anticorpos policlonais primários PARP (cell signaling ; 1:1000) e β – Act (Sigma; 1:2000). Após 3 lavagens de 10 min. cada, com TTBS, as membranas foram incubadas com anticorpos

secundários conjugados com peroxidase contra coelho 1:2000 e 1:2000 contra camundongo (β -actina), durante 24 h a 4°C (GE Healthcare). Após 3 lavagens de 10 min. cada, com TTBS, a quimioluminescência das amostras foi detectada utilizando filme de raio-x. O filme foi escaneado e a intensidade de luz da banda foi analisado usando o software Image J (desenvolvido em U.S. National Institutes of Health disponível em <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

Análise estatística

Os dados comportamentais foram analisados utilizando análise de medidas repetidas de variância (ANOVA) seguido pelo pós teste de Tukey. Para avaliar o efeito da insulina entre os grupos, foi realizado um teste t Student. Para analisar as diferenças entre as idades utilizou-se ANOVA de uma e duas vias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos em $p < 0,05$.

5. Referências

George Paxinos, 2004. The rat Nervous Systems, ed. Elsevier Academic Press, USA, third edition. MENNO P. WITTER AND DAVID G. AMARAL, Chapter 21 Hippocampal Formation, pp. 637 – 687.

Siegel GJ., Agranoff BW., Albers RW., Fisher S.K., Uhler MD, 1999. Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular and Medical aspects. 6 ed.

Chiu SL, Chen CM, Cline HT, 2008. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron* 58:708-719

Craft S, Watson GS, 2004. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.* 3:169-78.

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* 7:45-61

Driscoll I, Hong NS, Craig LA, Sutherland RJ, McDonald RJ, 2008. Enhanced cell death and learning deficits after a mini-stroke in aged hippocampus. *Neurobiol Aging* 29:1847-1858.

Fried LP, 2000. Epidemiology of aging. *Epidemiol Rev.* 22: 95-106.

Gispén WH. & Biessels G., 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *TINS* 23: 542-549.

Haug, H., Kuhl, S., Mecke, E., Sass, N.L., Wasner, K, 1984. The significance of morphometric procedures in the investigation of age changes in cytoarchitectonic structures of human brain. *Journal Hirnforsch.* 25: 353 – 74.

Jackson TC, Foster TC, 2009. Regional Health and Function in the hippocampus: Evolutionary compromises for a critical brain region. *Biosci Hypotheses* 2:245-251.

Kesner RP, 2007. Behavioral functions of the CA3 sub region of the hippocampus. *Learn Mem* 14:771-781

McNay EC., Ong CT., McCrimmon RJ., Cresswell J., Bogan JS., Sherwin RS, 2010. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem* 93(4):546-53.

Morrison J.H., Hof P.R, 1997. Life and Death of Neurons in the Aging Brain. *Science*, 278 (5337): 412 – 419.

Moosavi M., Naghdi N., Maghsoudi N., Zahedi SA, 2006. The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. *Horm Behav* 50:748-752.

Moosavi M., Naghdi N., Choopani S., 2007. Intra CA1 insulin microinjection improves memory consolidation and retrieval. *Peptides* 28:1029-1034

Muller AP., Gnoatto J., Moreira JD., Zimmer ER., Haas CB., Lulhier F., Perry ML., Souza DO., Torres-Aleman I., Portela LV., 2010. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: Physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* [Epub ahead of print].

Ott A., Stolk RP., van Harskamp F., Pols HA., Hofman A., Breteler MM., 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53:1937-1942.

Park CR., Seeley RJ., Craft S., Woods SC., 2000. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav* 68:509-514

Park CR., 2001. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 25:311-323.

Peterson GLA., 1977. Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356

Rosenzweig ES., Barnes CA., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69:143-179

Songin M, Jêoeko H, Czapski G, Adameczyk A, Strosznajder RP., 2007. GSK-3 β and oxidative stress in aged brain. Role of poly(ADP--ribose) polymerase. *Folia Neuropathol* 45: 220-229.

Steen E., Terry BM., Rivera EJ., Cannon JL., Neely TR., Tavares R., Xu XJ., Wands JR., de la Monte SM., 2005. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 7:63-80.

Strosznajder JB., Jêoeko H., Strosznajder RP., 2000. Age-related alteration of poly(ADP-ribose) polymerase activity in different parts of the brain. *Acta Bioc. Polonica* 47:331-337.

Strosznajder RP., Jêoeko H., Adamczyk A., 2005. Effect of aging and oxidative/genotoxic stress on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in rat brain. *Acta Bioc. Polonica* 52:909–914.

Van der Heide LP., Ramakers GM., Smidt MP., 2006. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol* 79:205-221.

Whitwell JL., Jack CR., 2005. Comparisons between Alzheimer disease, frontotemporal lobar degeneration, and normal aging with brain mapping. *Top Magn Reson Imaging* 16:409-425.

Ziv I, Melamed E, 2010. Editorial: apoptosis in the aging brain. *Apoptosis* Sep 7. [Epub ahead of print]

6. Legendas das Figuras

Figura 1: Avaliação da locomoção espontânea de ratos jovens e velhos submetidos ao tratamento com insulina icv no Campo Aberto. Animais velhos se locomoveram menos que animais jovens ($p < 0,05$).

Figura 2: Avaliação do aprendizado espacial de ratos jovens e velhos submetidos ao tratamento com insulina icv pela metodologia de Labirinto Aquático de Morris durante 5 dias de treinamento – fase de aquisição da memória (A) e no sexto dia do teste - fase de

retenção (dia teste) (B). Animais jovens tratados apresentaram melhora na performance no teste tanto na fase de aquisição como na fase de retenção ($p < 0,05$).

Figura 3: Análise imunohistoquímica de neurônios (A), astrócitos (B) e núcleos (C) na sub-região CA1 do hipocampo. O envelhecimento diminuiu a quantidade de neurônios na região CA1 do hipocampo e a insulina foi capaz de reverter esse efeito (A). O tratamento com insulina icv aumentou a reatividade glial em ratos velhos (B). A quantidade total de núcleos parece estar diminuída em ratos velhos e a insulina icv aumentou a fluorescência da marcação para núcleos somente em animais jovens ($p < 0,05$).

Figura 4: Análise imunohistoquímica de neurônios (A), astrócitos (B) e núcleos (C) na sub-região CA3 do hipocampo. O envelhecimento diminuiu a quantidade de neurônios na região CA3 do hipocampo e a insulina não reverteu esse efeito (A). O envelhecimento aumentou a reatividade glial em ratos velhos (B). A quantidade total de núcleos não foi alterada com o envelhecimento nem com o tratamento com insulina icv na sub-região CA3 do hipocampo ($p < 0,05$).

Figura 5: Análise imunohistoquímica de neurônios (A), astrócitos (B) e núcleos (C) na sub-região GD do hipocampo. O envelhecimento diminuiu a quantidade de neurônios na sub - região GD e a insulina reverteu esse efeito (A). O envelhecimento não alterou a reatividade glial dos animais (B). A quantidade total de núcleos não foi alterada com o envelhecimento nem com o tratamento com insulina icv na sub-região GD do hipocampo ($p < 0,05$).

Figura 6: Análise por Western Blotting do imunoc conteúdo de PARP / β -Act. O tratamento foi capaz de diminuir esse parâmetro somente em ratos velhos a níveis semelhantes a ratos jovens controles ($p < 0,05$).

7. Figuras

Figura 1

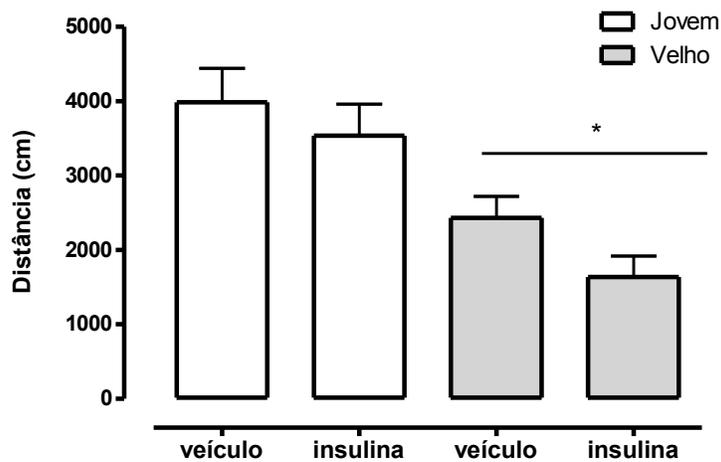
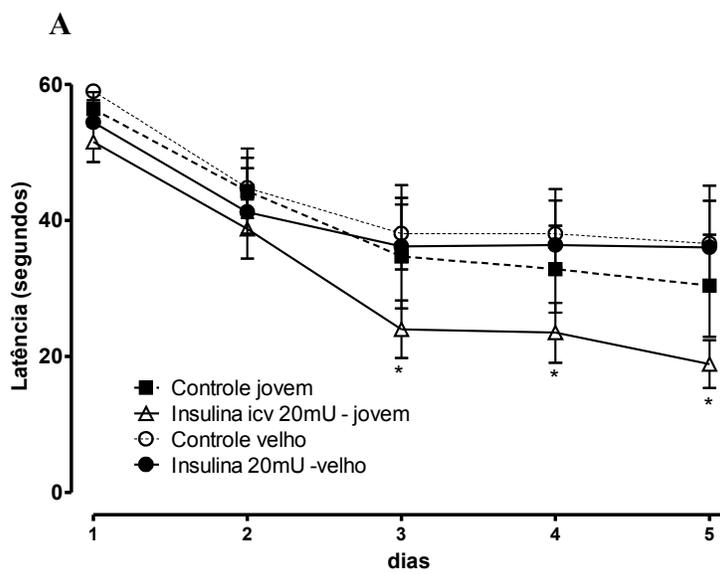


Figura 2



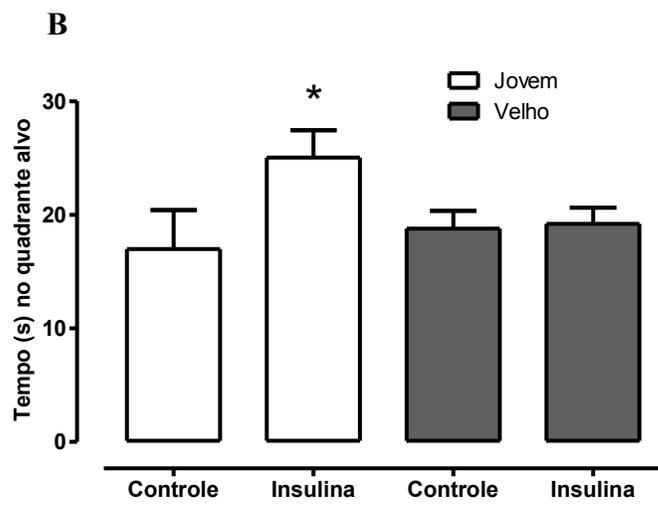


Figura 3

Jovem veículo Jovem insulina Velho veículo Velho insulina

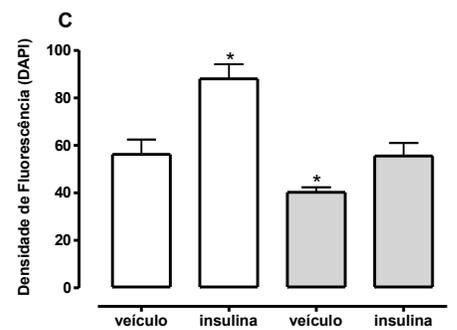
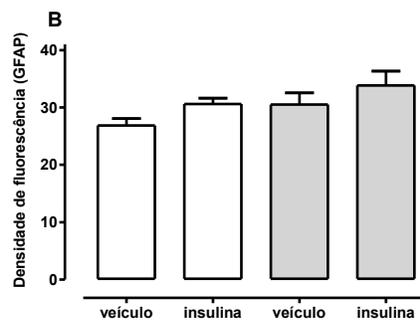
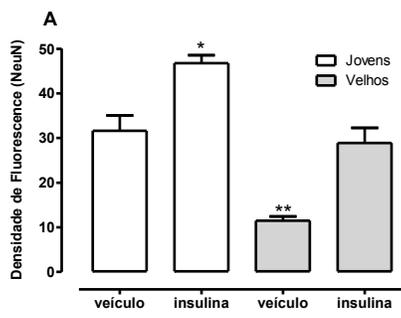
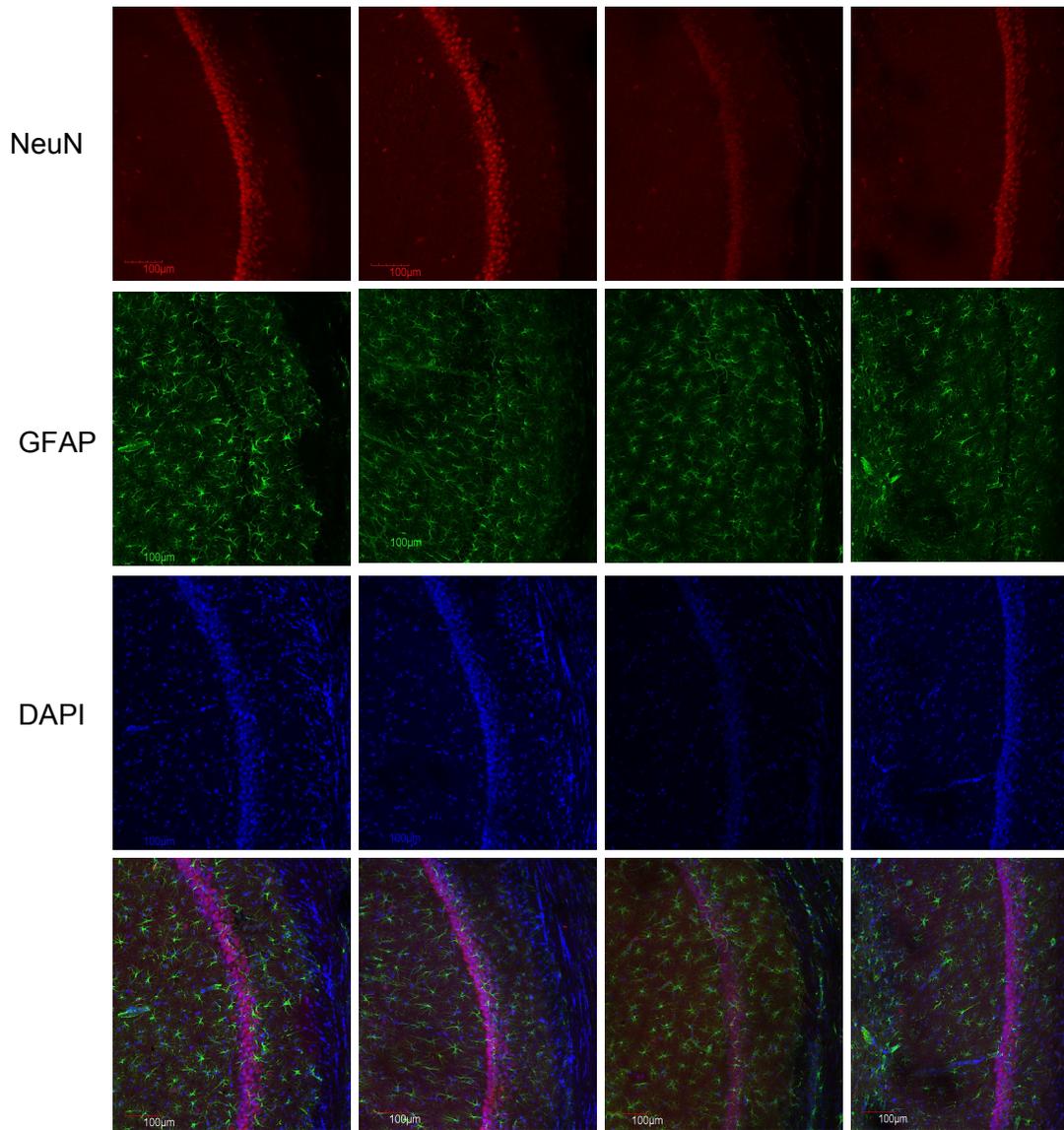


Figura 4

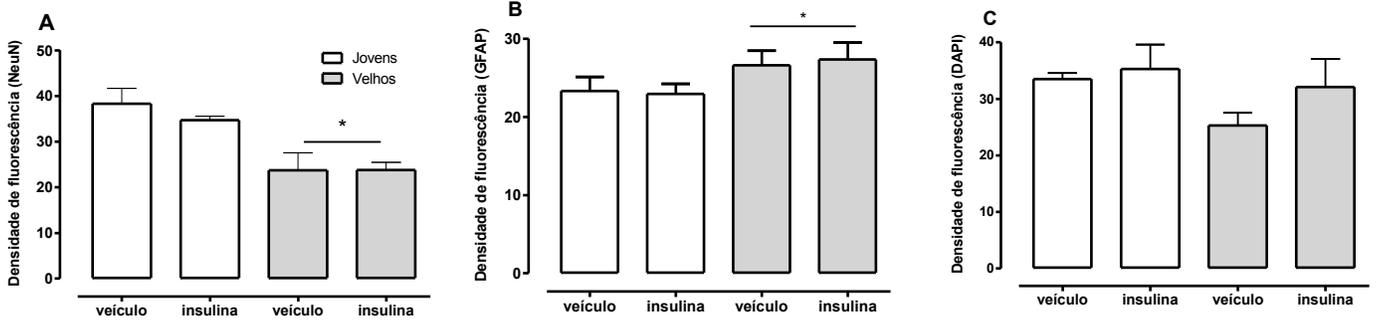
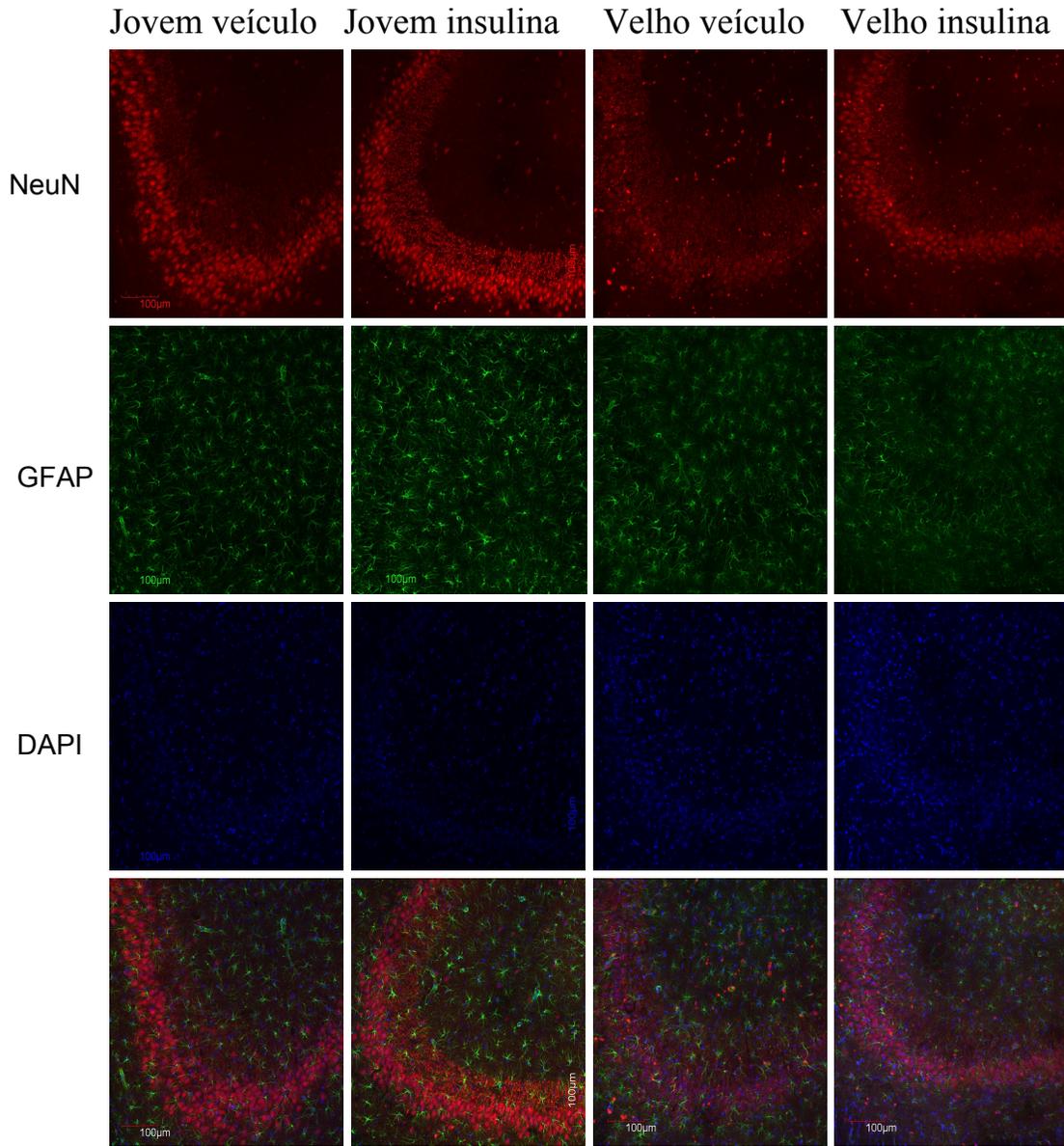


Figura 5

Jovem veículo Jovem insulina Jovem veículo Velho insulina

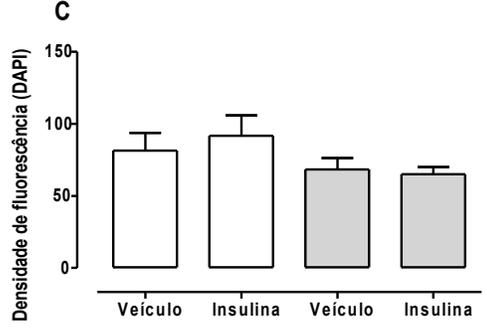
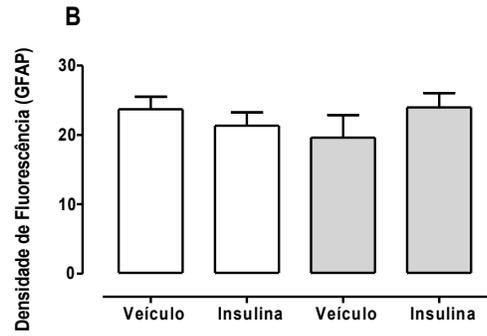
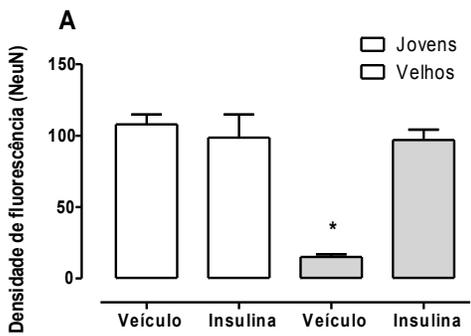
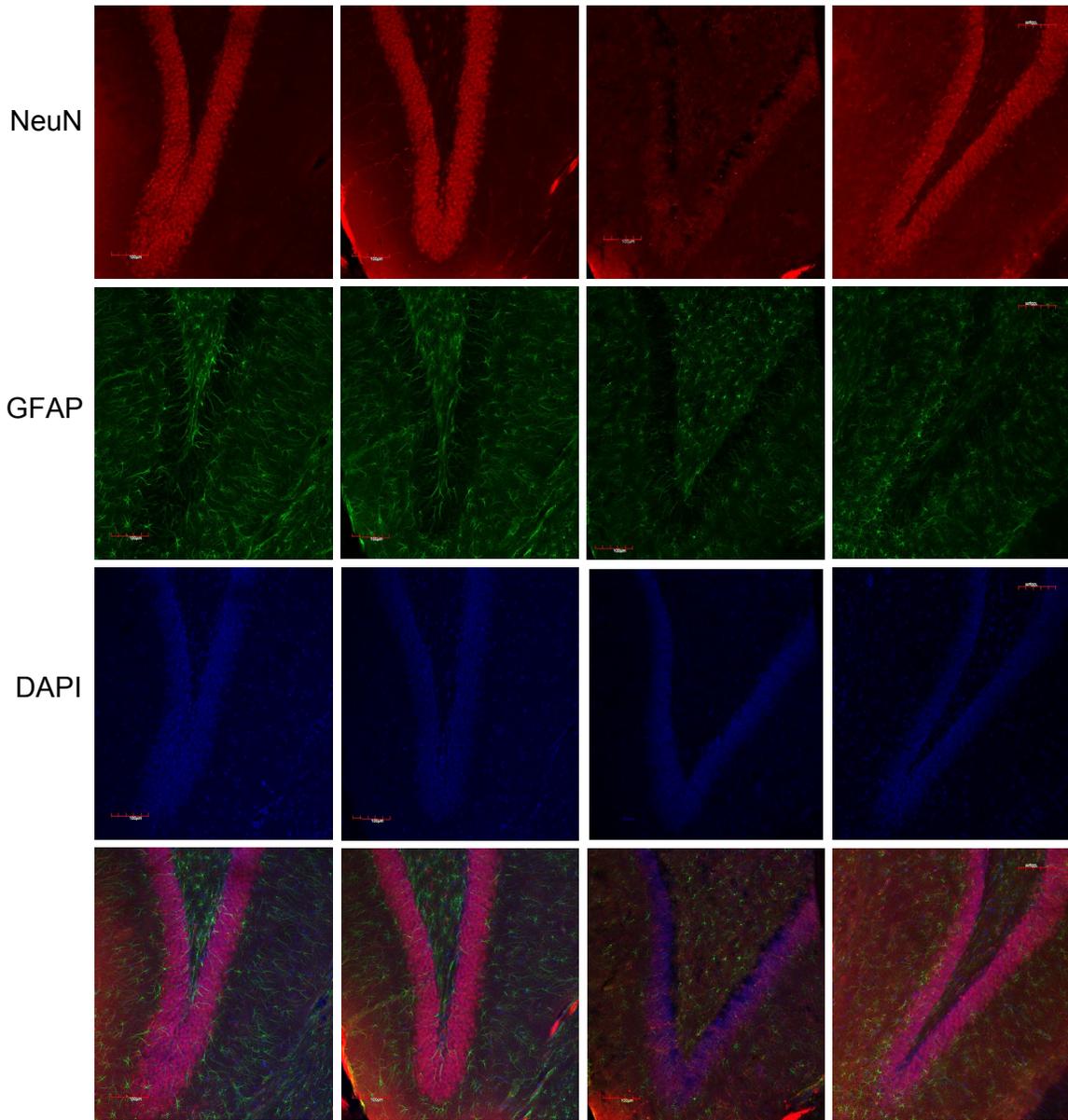
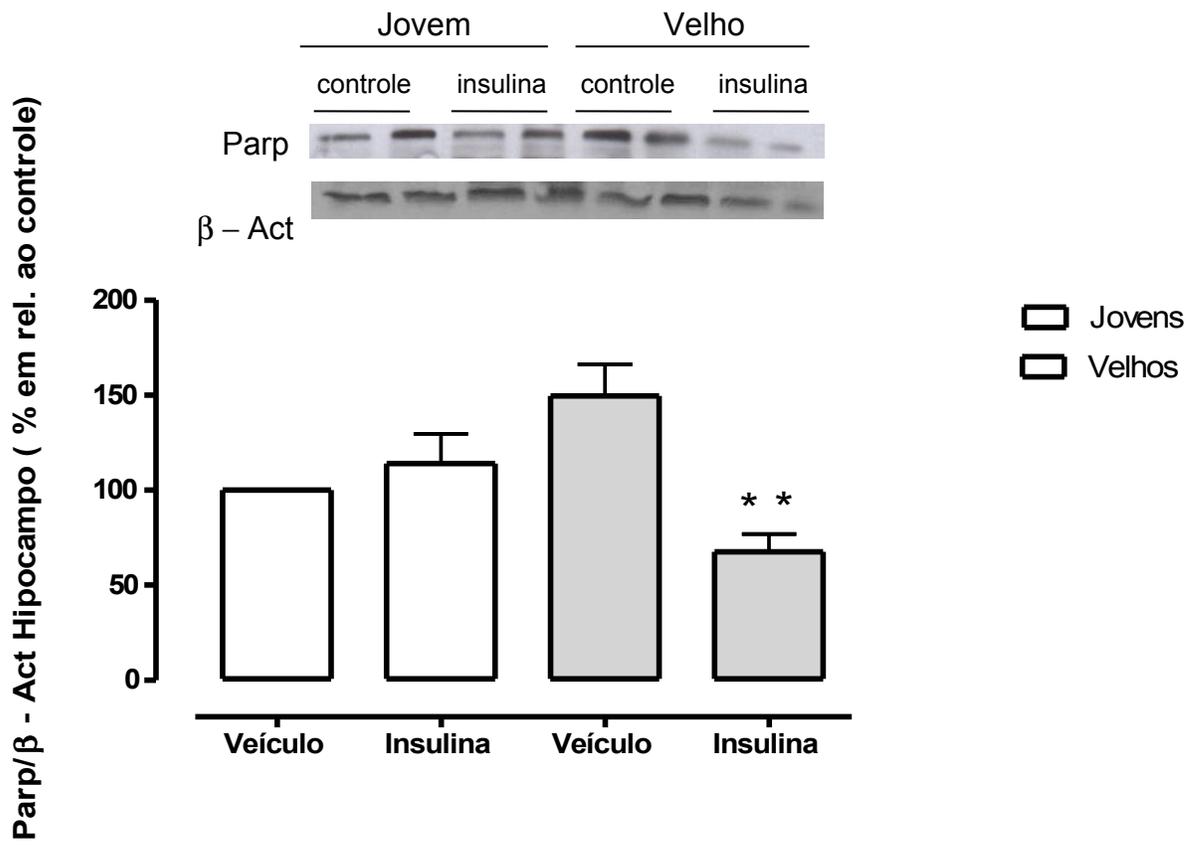
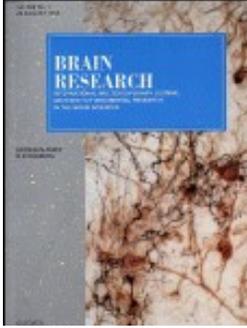


Figura 6





Brain Research

SUBMISSION POLICY

Submission of a paper to Brain Research is understood to imply that it deals with original material not previously published, and that it is not being considered for publication elsewhere. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed Authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all Authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the article shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the written consent of the Editors and Publisher.

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, email permissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10,000 and above). Authors in Japan please note that, upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier, 4F Higashi- Azabu, 1 Chome Bldg, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; Tel. (03)-5561-5032; fax (03)-5561-5045; e-mail: jp.info@elsevier.com. The layout and style should adhere strictly to the instructions given under "Organisation of the Article".

No revisions or updates will be incorporated after the article has been accepted and sent to the Publisher (unless approved by the Editors).

PREPARING ELECTRONIC MANUSCRIPTS

Keep text, tables and graphics (and any other items) as separate files - do not import the figures or tables into the text file. Name your files using the correct extension, e.g. text.doc, fig1a.eps, fig1.tif, Fig1.jpg, tbl1-6.xls, etc.

Text files should be supplied in one of the following formats: Microsoft Word or WordPerfect, Windows or Macintosh formatted. Ensure that the letter "l" and the digit "1" (also letter "O" and digit "0") have been used properly, and format your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your wordprocessor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open, but indicated by a unique code (e.g. galpha, @, #, etc. for the Greek letter alpha). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key.

When accepted articles are processed, most formatting codes will be removed or replaced so there is no need for you to use excessive layout styling. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). However, do use bold face, italic, subscripts, superscripts etc. for scientific nomenclature. When preparing tables, if you are using a table grid, please use only one grid for each separate table and not a grid for each row. If no grid is being used, use tabs to align columns, not spaces.

Graphic files: See the Elsevier website <http://authors.elsevier.com/artwork> for guidelines for preparing electronic artwork. N.B. With Web submission, only the following formats are acceptable: TIFF, PDF and EPS. Each figure should be a separate file and not be embedded in the text.

All graphic files must be submitted in sufficiently high resolution (300 dpi for grayscale or colour images and 600-1000 dpi for line art) to allow for printing. Preparation of supplementary data. Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats.

Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/artwork>. Electronic submission of articles via the Web (<http://www.ees.elsevier.com/bres>) Full instructions for uploading data and files etc. are given on the website when submitting a

manuscript. It is the responsibility of the Authors to create the proper files as instructed above for the electronically submitted manuscript. The editorial office cannot make conversions beyond the supported file types.

No hardcopy manuscripts or illustrations are to be sent to the Editors unless specifically requested. Please note that the electronic files supplied will always be used to produce the illustrations, including those for the print version of the article; it is the Authors' responsibility to ensure that these files are of suitable quality.

ORGANIZATION OF THE ARTICLE

Title page. The title page should contain the following items: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables) and the number of figures and tables; (v) the name and complete address of the corresponding Author (as well as telephone number, facsimile number and E-mail address, and if available URL address) to whom correspondence and proofs should be sent.

Abstract. This should provide a concise description of the purpose of the report or summary of the review and should not exceed 250 words. References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list.

Classification terms (to be placed under the Abstract):

Section. One term should be selected from the 9 (sub)Section headings listed above under "Scope".

Keywords. Provide a maximum of six keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Research Reports and Reviews should be divided into numbered sections headed by a caption (e.g. Abstract, 1. Introduction, 2. Results, 3. Discussion, 4. Experimental Procedure, Acknowledgements, References).

Introduction. In this section, the objectives of the research should be clearly stated. Relevant background information and published studies should be described concisely, and be cited appropriately.

Results. The results should be described clearly and concisely, and in logical order without extended discussion of their significance. Results should usually be presented descriptively and be supplemented by photographs or diagrams.

Discussion. The results of the research should be discussed in the context of other relevant published work, and as concisely as possible. Extensive citations and discussion of published literature should be avoided.

Experimental Procedure. This section should contain all the details necessary to reproduce the experiments. Avoid re-describing methods already published; only relevant modifications should be included in the text.

Literature references. All references cited in the text should be listed at the end of the manuscript on a separate page, arranged in alphabetical order of first author then year of publication. The references should include only articles that are published or in press.

Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only. Personal communications should be documented by a letter of permission. Abstracts of work presented at meetings may not be cited. All items in the list of references should be cited in the text and, conversely, all references cited in the text must be presented in the list. The abbreviations of journal titles should conform to those adopted by the List of Serial Title Word Abbreviations, CIEPS/ISDS, Paris, 1985 (ISBN 2-904938-02-8).

Please use the following style for references:

Article in a periodical:

Allan, K., Doyle, M.C., Rugg, M.D., 1996. An event related potential study of wordstem cued recall. *Cognitive Brain Res.* 4, 251-262.

Chapter in a book (within a series):

Mize, R.R., 1994. Conservation of basic synaptic circuits that mediate GABA inhibition in the subcortical visual system. In *Neuroscience: From the Molecular to the Cognitive*. Progress in Brain Research, Vol. 100, F.E. Bloom, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 123-132.

An entire book:

Swanson, L.W., Bjorklund, A., Hokfelt, T., 1966, *Integrated Systems of the CNS, Part III: Cerebellum, Basal Ganglia, Olfactory System*. Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 12, Elsevier, Amsterdam.

URLs should be included for websites that are relevant to the article.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

Illustrations. Authors should consult the Elsevier website for guidelines for preparing (electronic) artwork: <http://authors.elsevier.com/artwork>. N.B. With Web submission, only the following formats are acceptable: TIFF, PDF and EPS. It should be borne in mind that in the journal illustrations will appear either across a single column (=8.3 cm) or a whole page (=17.6 cm). The illustrations should be numbered in Arabic numerals according to the sequence of appearance in the text, where they are referred to as Fig. 1, Fig. 2, etc.

Accepted manuscripts submitted on diskette, ZIP-disk or CD-ROM that include electronic files of the illustrations must be accompanied by a hardcopy set of the final illustrations.

All hardcopy illustrations should bear the author's name, the orientation (top, bottom, etc.) and be numbered. Hardcopy colour figures should be submitted as separate prints and not be mounted on cardboard.

If illustrations (or other small parts) of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to Brain Research, the written permission of the authors and publisher concerned must be included with the manuscript. The original source must be indicated in the legend of the illustration in these cases.

Figure legends should be concise and clear and should not duplicate the body of the text. Each illustration must have a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend and not be reproduced on the figure itself. The legends should be placed on a separate page at the end of the manuscript and begin with the number of the illustration they refer to. All symbols and abbreviations used in the figure must be explained.

Tables. Tables should be so constructed that they, together with their captions and legends, will be intelligible with minimal reference to the text. Tables of numerical data should each be typed (with double-spacing) on a separate page, numbered in sequence in Arabic numerals (Table 1, 2, etc.) and referred to in the text as Table 1, Table 2, etc.

The title of the table should appear above it. A detailed description of its contents and footnotes should be given below the body of the table.

PROOFS, OFFPRINTS, MISCELLANEOUS

Proofs

Authors should keep a copy of their article as proofs will be sent to them without the manuscript. Proofs will be sent by E-mail, as PDFs. Only printer's errors may be corrected; no change in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the Authors' responsibility. A form with queries from the copyeditor may accompany the proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. Corrections to the proofs must be returned by E-mail or Fax within 48 hours after receipt. If the Publisher receives no response from the Authors after 14 days, it will be assumed that there are no errors to correct and the article will be published.

Page charges

There are no page charges.

Offprints

25 offprints of each paper will be provided free of charge to the corresponding Author. Additional copies can be ordered at prices shown on the offprint order form which will be sent to the Author upon receipt of the accepted article at the Publisher.

POLICY ISSUES

When experimental animals are used, the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), or with the animals for experimental procedures.