

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

Jéssica Hauschild Taday

EFEITO DE AGENTES QUE MIMITIZAM ALGUMAS CARACTERÍSTICAS
INICIAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER SOBRE PARÂMETROS DE FUNÇÃO
ASTROCÍTICA E NO PROCESSAMENTO AMILOIDE EM CULTURAS
PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS

Porto Alegre, 2020

Jéssica Hauschild Taday

EFEITO DE AGENTES QUE MIMITIZAM ALGUMAS CARACTERÍSTICAS
INICIAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER SOBRE PARÂMETROS DE FUNÇÃO
ASTROCÍTICA E NO PROCESSAMENTO AMILOIDE EM CULTURAS
PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS

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

Orientadora: Prof^aDr^a Marina Concli Leite

Porto Alegre, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Taday, Jéssica Hauschild

Efeito de agentes que mimetizam algumas características iniciais da doença de Alzheimer sobre parâmetros de função astrocítica e no processamento amiloide em culturas primárias de astrócitos / Jéssica Hauschild Taday. -- 2020.

49 f.

Orientadora: Marina Concli Leite.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Doença de Alzheimer. 2. Astrócitos. 3. Neprilisina. 4. Enzima degradadora de insulina. I. Leite, Marina Concli, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo incentivo. Aos meus pais, Antonio e Dulce, por todo suporte, carinho e por estarem comigo em todos os momentos. Ao meu irmão, Jeferson, minha cunhada, Bruna, e ao Dudu, pela torcida.

Ao meu afilhado, Davi, por todos os momentos de alegria, amor e carinho.

A todos do laboratório 33 pela parceria e momentos compartilhados. Ao CA por ajudar na construção deste trabalho.

Ao laboratório 31M que me acolheu desde a iniciação científica. Desde os que já não estão presentes no convívio diário, Maria Cristina e Fafá, que me ensinaram tanto, até os que ainda vejo quase todos os dias, meninas da cultura Fe e Marina por toda ajuda e parceria nos momentos mais difíceis, Gabriel e Carol pelos ensinamentos e auxílio. Vocês todos são grandes inspirações como cientistas pra mim!

Aos ICs, Jefeli e Layra pela colaboração. E agradeço especialmente a Jose pela disponibilidade e auxílio em todo o trabalho.

À Marina, minha orientadora por todos ensinamentos, pela parceria, pelos conselhos e por toda dedicação mesmo na sua licença, que mesmo não estando tão perto esteve sempre tão presente.

À UFRGS e ao PPG Bioquímica por me permitirem realizar esse trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e Fapergs.

ÍNDICE

RESUMO	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
1.1. Doença de Alzheimer.....	7
1.1.1. Desenvolvimento da DA	8
1.2. Astrócitos e DA	11
1.3. Depuração de β -amiloide	12
1.3.1. Neprilisina	13
1.3.2. Enzima degradadora de insulina.....	14
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	15
3. Metodologia	15
3.1. Materiais	15
3.2. Cultura de astrócitos	16
3.3. Delineamento experimental	16
3.4. Viabilidade celular	17
3.4.1. Redução de MTT	17
3.4.2. Incorporação de vermelho neutro	17
3.5. Integridade celular	17
3.5.1. Atividade extracelular de lactato desidrogenase	17
3.5.2. Iodeto de propídio.....	18
3.6. Imunconteúdo e secreção de S100B	18
3.7. Imunoconteúdo de GFAP	18
3.8. Atividade da enzima glutamina sintetase.....	19
3.9. Conteúdo de glutathiona reduzida	19
3.10. Imunoquantificação de β A, NEP e IDE	20
3.11. Dosagem de proteínas	21
3.12. Análise estatística.....	21
4. Resultados	21
4.1. Efeito do MG, FC, LPS ou STZ na viabilidade e integridade celular	21
4.2. Efeito do MG, FC, LPS ou STZ sobre as proteínas marcadoras de astrócitos S100B e GFAP.....	22
4.3. Efeito do MG, FC, LPS ou STZ sobre a atividade da GS e o conteúdo de GSH	25

4.4. Efeito do MG, FC, LPS ou STZ sobre o imunoconteúdo do peptídeo β A e das enzimas NEP e IDE	27
5. Discussão.....	29
5.1. Parâmetros Astrocíticos	29
5.2. Processamento amiloide	32
6. Conclusão	36
7. Perspectivas.....	36
8. Apoio financeiro.....	36
9. Referências bibliográficas	37

RESUMO

Os astrócitos são as células mais numerosas do sistema nervoso central, disfunções dessas células estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais comum e costuma ser diagnosticada em estágios mais avançados, onde os pacientes já apresentam prejuízo cognitivo e perda de memória. Fisiologicamente a doença de Alzheimer é caracterizada pela formação de placas amiloides, devido ao acúmulo de peptídeo β A e formação de emaranhados neurofibrilares, resultantes da hiperfosforilação da proteína neuronal tau. Muitos estudos relacionam o início do desenvolvimento da doença com a presença de outras patologias e disfunções. Um dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer é o diabetes mellitus tipo 2, que entre outras alterações, aumenta a glicação de proteínas, o que pode ser mimetizado *in vitro* pelo metilglioxal (MG), que é um composto propagador de reações desse tipo. Sabe-se também que nos estágios iniciais da doença de Alzheimer pode ocorrer uma diminuição do metabolismo de glicose no sistema nervoso central, ou ainda o desenvolvimento de inflamação, fenômenos que podem ser induzidos em astrócitos *in vitro* por exposição a fluorocitrato (FC) e lipopolissacarídeo (LPS), respectivamente. Um dos modelos animais da doença de Alzheimer esporádica mais usados é o de administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ), composto que induz o desenvolvimento de alterações patológicas características desta doença. A deposição das placas amiloides ocorre pelo acúmulo do peptídeo β -amiloide após a clivagem da proteína precursora amiloide, através da ação da enzima β -secretase. Os astrócitos possuem enzimas que estão envolvidas na degradação deste peptídeo, como a neprilisina (NEP) e a enzima de degradação da insulina (IDE) e a redução da atividade destas duas enzimas já foi relacionada ao acúmulo de β -amiloide. Apesar disso, ainda não se sabe a relação entre os mecanismos envolvidos no aumento da produção do peptídeo com a diminuição de sua depuração. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da exposição de agentes que mimetizam algumas características iniciais da doença de Alzheimer em astrócitos sobre parâmetros de função astrocítica, bem como a expressão das enzimas de degradação do peptídeo β -amiloide. As culturas primárias de córtex de ratos Wistar neonatos foram expostas a MG (5, 50 ou 500 μ M), FC (1, 10 ou 100 μ M), LPS (0,1; 1 ou 10 μ g/mL) ou STZ (2,5; 25 ou 250 μ M) e após 24h foram avaliados parâmetros astrocíticos e a expressão de proteínas relacionadas ao processamento amiloide. Nossos resultados mostraram que todos os insultos testados foram capazes, em diferentes concentrações, de diminuir a secreção da proteína S100B, aumentar o conteúdo de GFAP e aumentar a atividade de GS nas culturas de astrócitos. Entretanto, apenas LPS e STZ foram capazes, nas concentrações mais altas, de diminuir a expressão da enzima IDE e apenas a STZ aumentou a expressão de β A. Dessa forma mostramos que esses diferentes tipos de insultos (glicante, inflamatório ou metabólico) podem ter efeitos similares em astrócitos, ao menos no que se refere aos parâmetros astrocíticos avaliados, porém em relação ao processamento amiloide apenas o LPS e a STZ foram capazes de causar alterações.

ABSTRACT

Astrocytes are the most numerous cells in central nervous system and dysfunction of these cells are related to development of neurodegenerative diseases. Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease and usually is diagnosed in more advanced stages, in which patients have cognitive impairment and memory loss. Physiologically, Alzheimer's disease is characterized by amyloide plaques formation due to A β deposition and neurofibrillary tangles formation resulting from hyperphosphorylation of the neuronal protein tau. Many studies relate the beginning of the development of the disease with the presence of other pathologies and dysfunctions. Diabetes mellitus type 2 is a risk factor for Alzheimer's disease. Among other changes, the increase in protein glycation can be mimic *in vitro* by methylglyoxal (MG), which is able to spread reactions of this type. It is known that in the pre-clinical phase of Alzheimer's disease occur a decrease in central nervous system glucose metabolism and neuroinflammation, that can be induced *in vitro* by fluorocitrate (FC) and lipopolysaccharide (LPS) exposure, respectively. One of the animal models of sporadic Alzheimer's disease most used is based on an intracerebroventricular streptozotocin (STZ) administration, which can induces the development of some characteristic pathologic alterations of this disease. Amyloide plate deposition occurs by A β peptide accumulation after cleavage of amyloid protein precursor, by β -secretase enzyme. Astrocytes are involved in this peptide degradation by neprilysin (NEP) and insulin degrading enzyme (IDE). The decrease of the activity of these enzymes have already be related to A β accumulation. Despite that it is still not known the relationship between the mechanisms involved in the increase of peptide production and its clearance. Thus, the objective of this work was evaluated the effects of mimicking agents of some initial characteristics of Alzheimer's disease in astrocytes. Primary cultures of astrocytes were exposed to MG (5, 50 or 500 μ M), FC (1, 10 or 100 μ M), LPS (0,1, 1 or 10 μ g/mL) or STZ (2,5, 25 or 250 μ M) for 24 h before astrocytic parameters and amyloid processing proteins evaluation. Our data showed that all insults were capable of decrease S100B protein secretion, increase GFAP content and GS activity. However, only LPS and STZ could decrease IDE expression and only STZ could increase A β expression. Therefore, we showed that different insult (glycant, inflammatory or metabolic) can have similar effects in astrocytic parameters, however in relation to amyloide processing, only LPS and STZ were able to cause changes.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC - sistema nervoso central

DA - doença de Alzheimer

β A - beta amiloide

NEP - neprilisina

IDE - enzima degradadora de insulina

APP - proteína precursora amiloide

BACE - β -secretase

DM - diabetes mellitus

GFAP - proteína ácida fibrilar glial

GS – glutamina sintetase

GSH - glutationa reduzida

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

VN - vermelho neutro

IP - iodeto de propídeo

LDH - lactato desidrogenase

AGEs - produtos finais de glicação avançada

MG - metilglioxal

FC - flourocitrato

LPS – lipopolissacarideo

STZ - estreptozotocina

TNF α - fator de necrose tumoral

INF γ –interferon γ

ICV - intracerebroventricular

GLUT-2 - transportador de glicose 2

IR - receptor de insulina

GSK-3 - glicogênio sintase cinase-3

Introdução

1.1. Doença de Alzheimer

Doenças neurodegenerativas são doenças de origem complexa que levam a uma disfunção irreversível do sistema nervoso central (SNC), sendo as mais comuns a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (Taipa, Pinho et al. 2012).

A DA é a doença neurodegenerativa que atinge mais pessoas em todo o mundo e a tendência é atingir ainda mais cidadãos nos próximos anos, uma vez que com o aumento da expectativa de vida também é esperado um aumento da ocorrência de patologias relacionadas à idade (Taipa, Pinho et al. 2012, Long and Holtzman 2019).

Existem duas classificações para a DA, a DA familiar e a DA de início tardio. A DA familiar apresenta um componente genético envolvido, sendo manifestada por pacientes entre 30 e 50 anos, esta forma da doença é responsável pela minoria dos casos (Thambisetty, An et al. 2013). A forma mais comum da DA é a de início tardio, também chamada de esporádica, na qual não há envolvimento de fatores genéticos. Seu mecanismo de desenvolvimento ainda não foi esclarecido, porém se sabe que ela está relacionada a vários outros processos patológicos (Zetterberg and Mattsson 2014).

O primeiro diagnóstico da DA ocorreu em 1906, realizado pelo psiquiatra e neuropatologista alemão, Alois Alzheimer. Ele observou um paciente que apresentava comprometimento cognitivo e perda de memória. Em autopsia cerebral, após a morte do paciente, encontrou depósitos de placas senis e emaranhados neurofibrilares (Fiça, Enciu et al. 2011).

Ainda hoje os achados de Alois Alzheimer continuam sendo utilizados na caracterização e no diagnóstico da doença. Clinicamente, a DA é descrita pela

presença de déficits cognitivos, seguidos de perda progressiva de memória e confusão mental (Soria Lopez, González et al. 2019). Já entre as alterações fisiopatológicas características estão a formação de placas amiloides, devido ao acúmulo de peptídeo β -Amiloide (β A) no espaço extracelular e formação de emaranhados neurofibrilares, resultantes da hiperfosforilação da proteína neuronal tau no espaço intracelular, levando à atrofia do córtex cerebral (Serý, Povová et al. 2013).

1.1.1. Desenvolvimento da DA

Apesar de já se ter um vasto conhecimento das manifestações clínicas e fisiopatológicas da DA, a forma como esta doença se desenvolve ainda não foi elucidado por completo. Entretanto, muitas evidências sugerem a participação de vários fatores no seu desenvolvimento (Zetterberg and Mattsson 2014, Long and Holtzman 2019).

Entre os fatores que estão presentes na DA está uma diminuição da função colinérgica devido à diminuição da enzima colina acetiltransferase e morte dos neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meyner. Também é possível observar uma desregulação da sinalização de cálcio, em consequência da ativação do receptor glutamatérgico do tipo NMDA, causando uma resposta excitotóxica (Zetterberg and Mattsson 2014, Soria Lopez, González et al. 2019).

Uma das hipóteses mais estudada para o desenvolvimento da DA é a da cascata amiloide, que propõe que a deposição de placas e a formação dos agregados de peptídeo β A estão elevados, ou ainda que a depuração deste peptídeo está prejudicada. O β A é o produto da clivagem da proteína precursora amiloide (APP) pelas enzimas γ -secretase e β -secretase (BACE), que pode formar peptídeos com 40 ou 42 aminoácidos (β A₁₋₄₀ e β A₁₋₄₂) (Serý, Povová et al. 2013,

Zetterberg and Mattsson 2014). Mais recentemente tem sido descrita também a formação do βA_{25-35} (Domínguez-Prieto, Velasco et al. 2018). Existem vários modelos animais para o estudo da DA *in vivo*. Um dos mais amplamente utilizados é a injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ), que induz o desenvolvimento de fatores de risco e alterações patológicas características desta doença (Rodrigues, Biasibetti et al. 2009). O mecanismo pelo qual esse composto age no SNC ainda não é completamente estabelecido; entretanto, em astrócitos, já foi demonstrado que a STZ aumenta a expressão da APP, bem como da enzima envolvida na sua clivagem, BACE, que resulta na formação do peptídeo β -amilóide, um dos marcadores dessa patologia (Rajasekar, Dwivedi et al. 2014).

Um dos fatores que predis põem o desenvolvimento da DA é o diabetes mellitus (DM), devido à presença de altas concentrações de glicose no SNC. Inclusive, a DA é chamada por alguns autores de “diabetes tipo 3” ou de “encefalopatia diabética” (Biessels, van der Heide et al. 2002, Kandimalla, Thirumala et al. 2017, Ninomiya 2019). Na hiperglicemia, o aumento das concentrações de glicose pode causar um aumento das reações de glicação que envolvem a formação de bases de Schiff, que são convertidas a produtos de Amadori. Essas reações tem como produtos compostos dicarbonil, como o metilglioxal (MG), que por sua vez leva a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Lapolla, Traldi et al. 2005, Craft 2007). Muitos trabalhos relacionam altos níveis de metilglioxal e de AGEs com aumento do prejuízo cognitivo em pacientes idosos (Biessels, Koffeman et al. 2006, Crane, Walker et al. 2013). Dessa forma, em estudos *in vivo e in vitro*, o MG é amplamente utilizado para mimetizar essas condições de altos níveis de MG e AGEs (Hansen, de Souza et al. 2012, Heimfarth, Loureiro et al. 2013, Chu, Lee et al. 2014), sendo, portanto,

um composto interessante também para se estudar alterações cerebrais que ocorrem na DA (Kuhla, Lüth et al. 2005, Angeloni, Zambonin et al. 2014).

Apesar da causa da DA ainda não ser conhecida, algumas alterações iniciais já estão bem estabelecidas. A glicose é o substrato energético mais utilizado pelo cérebro em indivíduos adultos e sabe-se que um hipometabolismo da glicose no SNC é uma das primeiras alterações observadas nos pacientes com DA. Essa alteração pode estar relacionada a problemas de transporte de glicose para dentro das células ou mesmo a distúrbios metabólicos intracelulares (Mosconi, Pupi et al. 2008). Existem compostos que são utilizados para induzir uma diminuição do metabolismo celular, com o fluorocitrato (FC), que é um composto amplamente utilizado para inibir o metabolismo de células gliais por agir inibindo a enzima aconitase, do ciclo de Krebs, levando a uma consequente diminuição da produção de ATP (Swanson and Graham 1994).

Outro componente muito importante no desenvolvimento da DA é a neuroinflamação. A presença de β A em concentrações elevadas no SNC leva a ativação das cascatas inflamatórias (Halliday, Robinson et al. 2000). Além disso, a liberação de citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (INF- γ) causam o aumento do processamento amiloidogênico da APP (Zhao, O'Connor et al. 2011). Um dos modelos de neuroinflamação mais utilizados *in vitro* é a exposição ao lipopolissacarídeo (LPS), molécula derivada da parede celular de bactérias gram-negativas (Haus-Wegrzyniak, Dobrzanski et al. 1998). Já foi mostrado que o LPS administrado *in vivo* é capaz de aumentar os níveis de placas amiloides, bem como os níveis de fosforilação da proteína tau no cérebro de ratos (Wang, Wu et al. 2018), além de causar prejuízo na memória de camundongos pelo aumento da atividade de β e γ -secretases e da expressão da

APP (Lee, Lee et al. 2008). Além disso, a exposição de culturas primárias de astrócitos a LPS juntamente com algumas citocinas pró-inflamatórias aumentaram a expressão de APP, BACE1 e a secreção de A β 40 (Zhao, O'Connor et al. 2011).

1.2. Astrócitos e DA

Os astrócitos são células que compõem a glia no SNC, desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase do SNC (Wang and Bordey 2008).

Disfunções astrocíticas estão associadas a diversas doenças, entre elas as doenças neurodegenerativas, como DA, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (Sofroniew and Vinters 2010, Khandelwal, Herman et al. 2011, Li, Li et al. 2019). Essas condições estão associadas a um aumento da reatividade astrocítica, causando alterações morfológicas e moleculares (Ben Haim, Carrillo-de Sauvage et al. 2015, Escartin, Guillemaud et al. 2019, Li, Li et al. 2019). Os astrócitos reativos rodeiam as placas amiloides e os emaranhados neurofibrilares no cérebro de pacientes com DA, apresentando uma expressão aumentada de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e S100B (Bronzuoli, Iacomino et al. 2016, Li, Li et al. 2019). Essas duas proteínas, GFAP e S100B, são marcadores de astrócitos, sendo amplamente avaliadas no estudo de disfunções dessas células. A S100B é uma proteína ligante de cálcio produzida e secretada por astrócitos no SNC e que pode exercer tanto papel trófico quanto tóxico, sendo considerada uma marcadora de dano cerebral (Donato 2001). Já a GFAP é uma importante proteína marcadora de astrócitos por constituir o seu citoesqueleto e está diretamente relacionada à reatividade astrocítica (Escartin, Guillemaud et al. 2019).

Muitos estudos têm mostrado que os astrócitos têm um importante papel na DA (Zhao, O'Connor et al. 2011, Thal 2012, Rodriguez-Arellano, Parpura et al.

2016). Já foi demonstrado que na DA as alterações astrocíticas ocorrem antes do aparecimento dos primeiros sintomas da doença (Leclerc and Abulrob 2013).

Os peptídeos β A já foram identificados em astrócitos de cérebros humanos (Wyss-Coray, Loike et al. 2003), que são capazes de produzir e secretar β A em quantidades significativamente altas, uma vez que expressam, em quantidades suficientes, todas as proteínas necessárias para a formação destes peptídeos: a APP, a BACE1 e a γ -secretase (Birch 2014). Todos esses componentes importantes na formação do β A tem sua expressão aumentada em astrócitos reativos, o que contribui para o aumento da produção do peptídeo β A (Frost and Li 2017).

Por outro lado, as células astrocíticas também podem desempenhar um papel positivo na prevenção da progressão da DA (Frost and Li 2017). Os astrócitos atuam na depuração e degradação do peptídeo β A, através de mecanismos enzimáticos, degradação proteossomal e autofágico, ou ainda via chaperonas extracelulares (Ries and Sastre 2016).

1.3. Depuração de β -amiloide

O desbalanço entre a formação e a degradação do peptídeo β A pode contribuir para o acúmulo e formação das placas amilóides (Miners, Barua et al. 2011). Diferentes mecanismos podem estar envolvidos nesse processos, entre eles um dos mais estudados é via proteases, como a neprilisina (NEP), a enzima degradadora de insulina (IDE) e enzimas de conversão de endotelina (Ries and Sastre 2016).

Alguns estudos sugerem que a ação destas enzimas sobre o peptídeo pode sofrer interferência por condições que predispõem a DA (Jha, Jha et al. 2015, Rajasekar, Nath et al. 2016). Os astrócitos são células gliais que estão envolvidas

na depuração de β A enzimaticamente, um acúmulo de β A nos astrócitos indica uma disfunção dessas enzimas, sugerindo o importante papel dessas células no desenvolvimento da DA (Thal 2012).

1.3.1. Neprilissina

A NEP é uma metaloprotease do grupo das endopeptidases que requer zinco para a sua atividade. Presente em vários tecidos, é capaz de degradar peptídeos biologicamente ativos como encefalinas, coleicistocinina, neurotencina e somatostatina, além do peptídeo β A (Bayes-Genis, Barallat et al. 2016).

Esta enzima é formada por 749 resíduos de aminoácido, possuindo 93 kD. Ela está presente ligada à membrana celular, tendo um domínio transmembrana e um pequeno domínio intracelular (Bayes-Genis, Barallat et al. 2016).

No SNC, esta enzima pode ser encontrada em neurônios, astrócitos e micróglia (Jha, Jha et al. 2015). A sua expressão está inversamente relacionada ao acúmulo de β A e à idade. Estudos *in vivo* demonstram que a redução da sua atividade contribui para o acúmulo de β -amiloide (Iwata, Tsubuki et al. 2001, Hellström-Lindahl, Ravid et al. 2008), sugerindo então seu envolvimento na degradação deste peptídeo. *In vitro*, diferentes estímulos se mostraram capazes de alterar a degradação do peptídeo β A através da modulação da NEP, como a leptina e a cetamina que diminuíram a sua expressão (Yamamoto, Arima et al. 2013, Yamamoto, Tanida et al. 2014) ou ainda como a sinvastatina, atrovastatina (Yamamoto, Fujii et al. 2016) e epigalocatequina galato, que aumentaram a sua expressão e secreção em culturas de astrócitos (Yamamoto, Shibata et al. 2017).

Recentes trabalhos vêm sugerindo esta enzima como possível alvo terapêutico para a DA, sendo um dos mecanismos propostos a sua manipulação através da regulação epigenética pelo domínio intracelular da APP (ACID). A

ACID é produzida no processamento da APP juntamente com o peptídeo β A, e parece desempenhar um papel na regulação transcricional do gene da NEP (Belyaev, Nalivaeva et al. 2009, Nalivaeva 2015, Nalivaeva and Turner 2019).

1.3.2. Enzima degradadora de insulina

Da mesma forma que a NEP, a IDE, também é uma metaloproteinase, dependente de zinco, que pesa 110 kD. Ela está presente no fígado, testículo, músculo e cérebro (Miners, Barua et al. 2011, Jha, Jha et al. 2015). No cérebro, pode ser encontrada em neurônios, oligodendrócitos, microglia (Ries and Sastre 2016) e astrócitos (Dorfman, Pasquini et al. 2010, Son, Cha et al. 2016). Esta enzima tem como substratos insulina, amilina e fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II, além do peptídeo β A (Dorfman, Pasquini et al. 2010).

Estudos com animais knock-out para IDE mostram um acúmulo de β A, além do desenvolvimento de hiperinsulinemia e intolerância à glicose, características da DA e DM2 (Farris, Mansourian et al. 2003). Já em culturas de astrócito foi demonstrado que tratamento com insulina é capaz de aumentar a expressão de IDE (Yamamoto, Ishikuro et al. 2018). Estes trabalhos reforçam o papel da IDE na depuração do peptídeo β A.

Apesar de já ser bem estabelecido o envolvimento das enzimas NEP e IDE na DA atuando na degradação do peptídeo β A, bem como a participação dos astrócitos no desenvolvimento da DA, pouco se sabe sobre a relação dos mecanismos envolvidos na formação de β A com as enzimas de degradação deste peptídeo em astrócitos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição de agentes que mimetizam algumas características iniciais da DA em astrócitos sobre parâmetros de função astrocítica, bem como a expressão das enzimas de degradação do peptídeo β -amiloide.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito dos agentes metilglioxal, fluorocitrato, lipopolissacarídeo e estreptozotocina sobre parâmetros de função de astrócitos em cultura primária, como S100B, GFAP, GSH e atividade de GS.

2.2.2. Avaliar o efeito dos agentes metilglioxal, fluorocitrato, lipopolissacarídeo e estreptozotocina sobre o imunconteúdo de β A, bem como das enzimas degradadoras deste peptídeo, NEP e IDE.

3. Metodologia

3.1. Materiais

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e outros materiais para cultura de células foram adquiridos da Gibco (California, USA). Poli-L-lisina, metilglioxal, fluorocitrato, lipopolissacarídeo, streptozotocina, anticorpo anti-S100B monoclonal (SH-B1), anticorpo anti-GFAP, anti-actina, glutationa, phthaldialdehyde (OPT), o-fenilenediamina (OPD), methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), iodeto de propídeo (IP) e vermelho neutro (VN) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA). Anticorpos anti-neprilisina e anti-enzima degradadora de insulina foram adquiridos da Abcam (Cambridge, MA, USA). Anticorpos anti-S100B policlonal e anti-rabbit peroxidase foram adquiridos da DAKO (São Paulo, Brasil) e GE (Little Chalfont, Reino Unido), respectivamente. O kit para atividade da LDH foi adquirido da Bioclin, (Belo Horizonte, Brasil).

3.2. Cultura de astrócitos

Foram utilizadas culturas primárias de astrócitos de ratos Wistar como previamente descrito (Gottfried, Valentim et al. 1999). Córtices cerebrais de ratos Wistar recém-nascidos foram removidos e dissociados mecanicamente. Após centrifugação a 300 x g por 5 min, o *pellet* foi suspenso em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e as células foram então semeadas em placas de 96, 24 ou 6 poços recobertas com poli-L-lisina. As culturas foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂/95% de ar a 37°C até atingirem a confluência (cerca de 21 dias).

3.3. Delineamento experimental

Após atingir a confluência (21 dias), o meio de cultura foi substituído por DMEM sem soro fetal bovino, na presença ou não de metilglioxal (5, 50 ou 500 µM), fluorocitrato (1, 10 ou 100 µM), lipopolissacarídeo (0,1; 1 ou 10 µg/mL), ou estreptozotocina (2,5; 25 ou 250 µM). Após 24 horas o meio de incubação foi coletado e as células lisadas, de acordo com os ensaios realizados. O delineamento experimental está ilustrado abaixo (Figura1):



Figura 1: Delineamento experimental. Culturas primárias de astrócitos de ratos Wistar neonatos após atingirem confluência, em aproximadamente 21 dias, foram expostas a MG, FC, LPS ou STZ por 24 h. Ao final, amostras de meio de cultura ou

lisado intracelular foram coletados para realização dos ensaios bioquímicos conforme descrito em cada metodologia.

3.4. Viabilidade celular

3.4.1. Redução de MTT

O composto 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) 0,05 mg/mL foi adicionado ao meio de cultura nos últimos 30 minutos do período de incubação. Em seguida, o meio foi removido e os cristais formados na redução deste composto foram dissolvidos em DMSO. A absorbância foi determinada em 560 e 650 nm e o resultado calculado pela diferença entre os valores obtidos (Guerra, Tortorelli et al. 2011). Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.4.2. Incorporação de vermelho neutro

O corante vermelho neutro (VN) 0,05 mg/mL foi adicionado ao meio nos últimos 30 minutos de incubação. Em seguida, o meio foi removido e após 2 lavagens com tampão fosfato, foi realizada a extração do corante com uma solução composta por ácido acético, etanol e água (1:50:49 v/v/v). A absorbância foi determinada em 560 nm (Guerra, Tortorelli et al. 2011). Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.5. Integridade celular

3.5.1. Atividade extracelular de lactato desidrogenase

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular foi determinada por kit comercial (Bioclin) para avaliação da integridade celular das células de acordo com instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.5.2. Iodeto de propídio

O corante iodeto de propídeo (IP) 0,007 mM foi adicionado ao meio de cultura nos últimos 15 minutos de incubação. Em seguida, as células foram avaliadas quanto à fluorescência nuclear por microscopia e a quantificação foi realizada em Spetramax I3. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.6. Imunconteúdo e secreção de S100B

O conteúdo e a secreção de S100B foram avaliados pelo método de ELISA de acordo com Leite e colaboradores (Leite, Galland et al. 2009). O conteúdo intracelular foi medido no lisado celular e a secreção no meio de incubação. As amostras acompanhadas de tampão tris, foram incubadas, durante 2 h em placa pré-incubada com anti-S100B monoclonal (SH-B1). Após, anti-S100B policlonal foi incubado por 30 minutos e, então, anti-*rabbit* conjugado com peroxidase foi incubado por mais 30 minutos. A reação colorimétrica com o-fenilenediamina (OPD) foi parada com ácido clorídrico e medida em 492 nm. O valor de concentração de S100B foi calculado a partir da comparação das absorbâncias das amostras com uma curva padrão de S100B, variando de 0,002 – 1 ng/mL e corrigido por proteínas totais na avaliação do imunconteúdo. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.7. Imunconteúdo de GFAP

O conteúdo de GFAP foi avaliado pelo método de ELISA como descrito anteriormente (Tramontina, Leite et al. 2007). Primeiramente foi realizado o revestimento das microplacas com as amostras durante 24 h a 4°C. Após, um anticorpo policlonal anti-GFAP foi incubado durante 1 h e em seguida um anticorpo secundário conjugado com peroxidase durante mais 1 h, ambos à

temperatura ambiente. A reação colorimétrica com OPD foi medida em 492 nm. O valor de concentração de GFAP foi calculado a partir da comparação das absorbâncias das amostras com uma curva padrão de GFAP, variando de 0,1 a 10 ng de GFAP, e corrigido pelo valor de proteínas totais. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.8. Atividade da enzima glutamina sintetase

A avaliação da atividade da enzima glutamina sintetase (GS) foi realizada de acordo com Minet e colaboradores (Minet, Villie et al. 1997) modificações. As células foram lisadas em tampão imidazol 50 mM (pH 6,8) e incubadas a 37°C em tampão A, contendo imidazol 50 mM, hidroxilamina 50 mM, L-glutamina 100 mM, arsenato de sódio 25 mM, ADP 0,2 mM e cloreto de manganês 2 mM, durante 15 minutos. A reação foi parada com tampão B, contendo cloreto férrico 0,37 M, ácido tricloroacético 0,2 M e ácido clorídrico 0,67 M. Em seguida, o produto corado foi centrifugado a 1000 xg por 15 minutos e o sobrenadante lido a 530 nm em espectrofotômetro. Para a curva padrão, foi pesado γ -glutamil-hidroxamato em concentrações variando de 0,156 mM a 10 mM e adicionados a tampão A e tampão B para comparação com as amostras ao calcular. O resultado foi corrigido pelos valores de proteínas totais. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.9. Conteúdo de glutathiona reduzida

O conteúdo da glutathiona reduzida (GSH) foi avaliado por técnica fluorimétrica (Browne and Armstrong 1998). As células foram lisadas em tampão fosfato-KCl (20 mM/140 mM) e em seguida foi adicionado ácido metafosfórico 4,6 mg/mL, seguido de centrifugação a 1000 xg durante 15 minutos. Os sobrenadantes das amostras foram transferidos para placas de 96 poços

juntamente com tampão GSH contendo fosfato de sódio monobásico 0,1 M e EDTA 0,005 M. Por fim, a placa foi incubada por 15 minutos, protegida da luz e a temperatura ambiente com o-phtaldehyde a 1 mg/mL diluído em metanol. A curva padrão foi realizada variando de 0,98 μ M a 500 μ M. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 nm e 420 nm, respectivamente. O resultado foi corrigido pelos valores de proteínas totais. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.10. Imunoquantificação de β A, NEP e IDE

O imunoconteúdo de β A, NEP e IDE foi avaliado pela técnica de eletroforese, transferência e imunoquantificação. As amostras de cultura foram lisadas em solução A contendo SDS 4%, EDTA 2 mM e tris 50 mM, e submetidas à desnaturação térmica a 100°C por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10000 xg por 5 minutos na temperatura de 4°C e, do sobrenadante, foi dosada a quantidade de proteína, em seguida adicionou-se solução B, contendo glicerol 40%, tris 50 mM e azul de bromofenol em quantidade suficiente para deixar azul escuro, e 5% de mercaptoetanol. A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% utilizando voltagem de 180 V durante 1 h, sendo aplicados 15 μ g de proteína por amostra. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando amperagem de 1,2 mA/área de membrana durante 1 h.

Para a realização da imunoquantificação as membranas foram bloqueadas com leite 5% diluído em TBS contendo 0,005% de Tween 20 (T-TBS) durante 1h à 4°C sob agitação leve. Os anticorpos anti- β A₁₋₄₀, NEP e IDE foram utilizados na concentração de 1:5000, incubados em T-TBS por 12 horas a 4 °C sob agitação leve. Os anticorpos secundários foram utilizados na concentração

de 1:5000 para anti- NEP e IDE e na concentração de 1:10000 para anti- β A₁₋₄₀. Entre cada uma das incubações, as membranas foram lavadas com T-TBS sob agitação leve e, ao final, foi realizada uma última lavagem por 10 minutos com TBS.

Para o controle de carga foi utilizado o corante india-ink diluído 5% em uma solução de 1% de ácido acético glacial em T-TBS e incubado por 3h a temperatura ambiente sob agitação leve.

Ao final as membranas foram expostas a reagente de revelação, contendo luminol e peróxido de hidrogênio para a detecção por quimiluminescência com o uso de fotodocumentador durante 5 min de exposição. As imagens obtidas foram quantificadas utilizando o software Image J. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao basal.

3.11. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método descrito por Lowry, modificado por Peterson (Peterson 1977).

3.12. Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada através do software SPSS por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Dunnett ou Duncan, conforme indicado nas legendas, sendo considerada uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Efeito do MG, FC, LPS ou STZ na viabilidade e integridade celular

Uma vez que nossos objetivos visam avaliar funções astrocíticas, é de extrema importância que, ainda que os astrócitos possam estar alterados em resposta a diferentes estímulos, a viabilidade e integridade celulares estejam mantidas. Dessa forma, os resultados de atividade enzimática, imunocontéudo e

secreção de proteínas que possamos observar serão exclusivamente devidos a modulação pelos estímulos e não devido a morte celular. Nenhum dos indutores das características iniciais da DA, MG, FC, LPS e STZ, mesmo nas concentrações mais altas testadas (500 μ M, 100 μ M, 10 μ g/mL e 250 μ M, respectivamente) causou alteração nos parâmetros de viabilidade celular, redução de MTT e incorporação de VN nas culturas de astrócitos (Tabela 1). Da mesma forma, na avaliação da integridade celular por IP e medida da atividade extracelular de LDH, nenhum dos insultos mostrou alteração indicando perda da integridade celular. Interessantemente, apenas o FC 100 μ M causou uma diminuição da atividade de LDH (Tabela1).

Tabela1: Efeito do MG, FC, LPS e STZ na viabilidade e integridade celular.

	MG	FC	LPS	STZ
MTT	102,5 \pm 3,3	102,9 \pm 3,3	99,4 \pm 2,1	102,8 \pm 2,0
VN	101,1 \pm 2,7	107,1 \pm 1,1	101,8 \pm 3,6	100,9 \pm 4,0
IP	103,5 \pm 2,4	89,1 \pm 3,7	97,5 \pm 3,4	98,7 \pm 2,2
LDH	101,0 \pm 5,3	59,4 \pm 5,6 *	96,2 \pm 4,5	97,1 \pm 4,7

Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão de pelo menos quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. * indica diferença do basal considerando um $p < 0,05$

4.2. Efeito do MG, FC, LPS ou STZ sobre as proteínas marcadoras de astrócitos S100B e GFAP

O conteúdo de S100B foi avaliado para os quatro insultos em todas as concentrações estudadas e apenas foi afetado pela exposição a STZ 250 μ M, que levou a uma diminuição dessa proteína no meio intracelular (Figura 2D). Já a secreção de S100B foi reduzida por todos os compostos, sendo que o MG apenas

na concentração de 500 μM (Figura 3A), o FC a partir de 10 μM (Figura 3B), o LPS a partir de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3C) e a STZ apenas em 250 μM (Figura 3D).

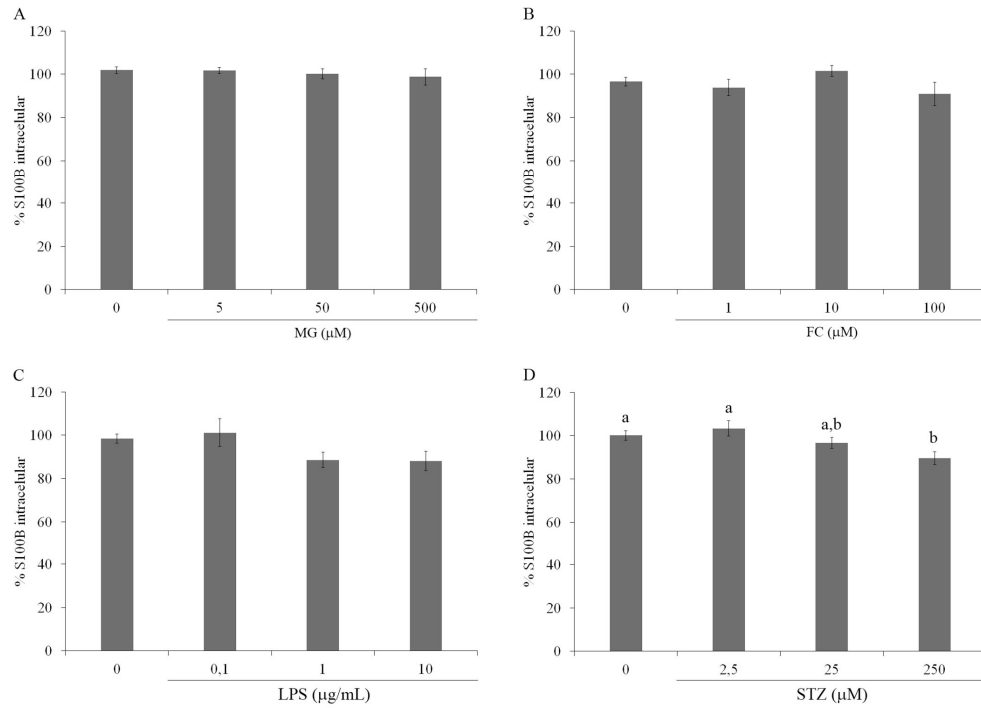


Figura 2: Efeito do MG, FC, LPS e STZ no conteúdo intracelular de S100B. A cultura primária de astrócitos foi exposta a (A) MG (5; 50 ou 500 μM), (B) FC (1; 10 ou 100 μM), (C) LPS (0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou (D) STZ (2,5; 25 ou 250 μM) por 24 h em DMEM sem SFB e ao final da incubação o conteúdo intracelular de S100B foi medido. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, assumindo $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

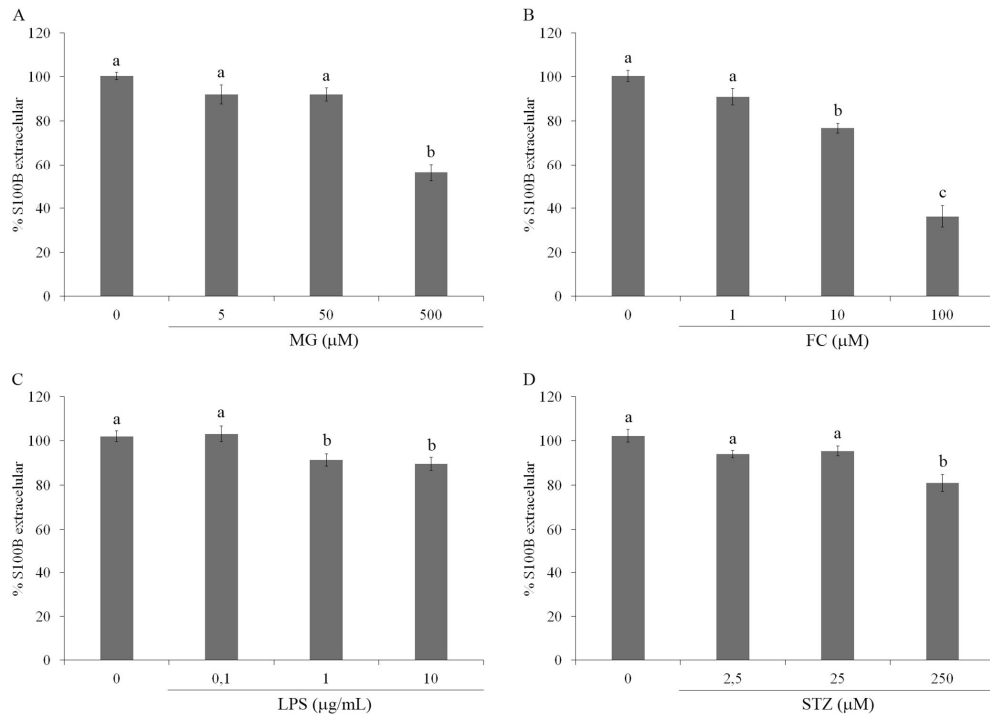


Figura 3: Efeito do MG, FC, LPS e STZ na secreção de S100B. A cultura primária de astrócitos foi exposta a (A) MG (5; 50 ou 500 μM), (B) FC (1; 10 ou 100 μM), (C) LPS (0,1; 1 ou 10 μg/mL) ou (D) STZ (2,5; 25 ou 250 μM) por 24 h em DMEM sem SFB e ao final da incubação a secreção de S100B foi medida. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão de pelo menos cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, assumindo $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

O conteúdo de GFAP foi alterado por todos os insultos, porém não em todas as concentrações avaliadas. O MG aumentou a GFAP a partir de 50 μM (Figura 4A), o FC a partir de 10 μM (Figura 4B), o LPS a partir de 1 μg/mL (Figura 4C) e a STZ em todas as concentrações testadas (Figura 4D).

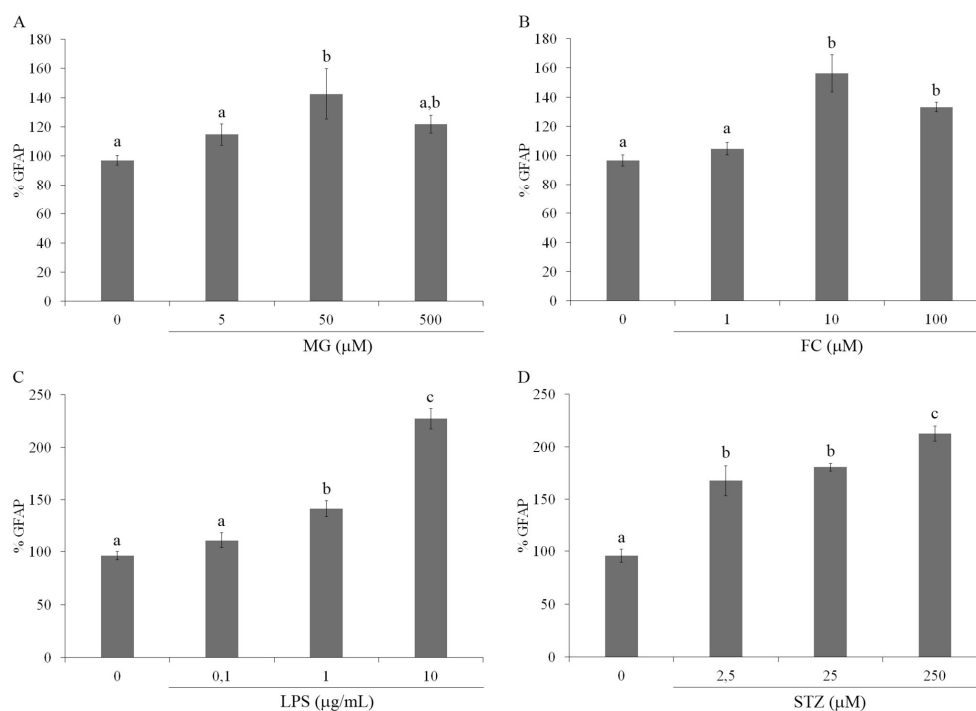


Figura 4: Efeito do MG, FC, LPS e STZ no conteúdo de GFAP. A cultura primária de astrócitos foi exposta a (A) MG (5; 50 ou 500 µM), (B) FC (1; 10 ou 100 µM), (C) LPS (0,1; 1 ou 10 µg/mL) ou (D) STZ (2,5; 25 ou 250 µM) por 24 h em DMEM sem SFB e ao final da incubação o conteúdo de GFAP foi medido. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão de pelo menos quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, assumindo $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

4.3. Efeito do MG, FC, LPS ou STZ sobre a atividade da GS e o conteúdo de GSH

A atividade da enzima GS foi aumentada por todos os insultos, porém não em todas as concentrações avaliadas. O MG aumentou a atividade da GS a partir de 50 µM (Figura 5A), o FC apenas na concentração de 10 µM (Figura 5B), o LPS apenas em 10 µg/mL (Figura 5C) e a STZ apenas em 250 µM (Figura 5D). O conteúdo de GSH ainda está sendo avaliado. Entretanto, resultados preliminares sugerem que nenhum composto, em nenhuma das concentrações avaliadas estaria causando alteração neste parâmetro (Figura 6).

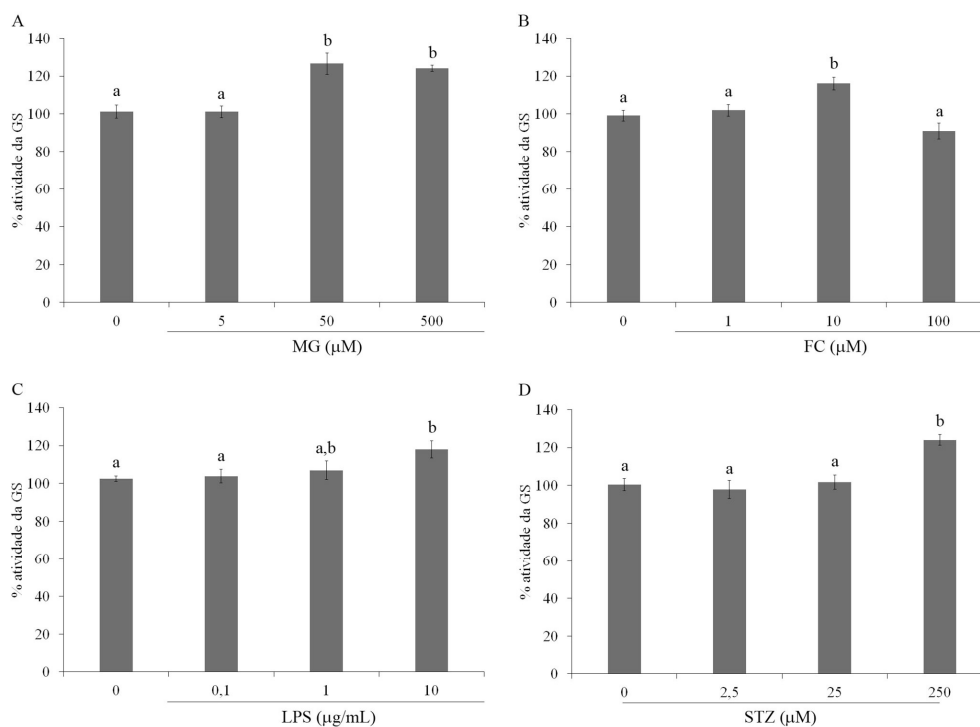


Figura 5: Efeito do MG, FC, LPS e STZ na atividade da GS. A cultura primária de astrócitos foi exposta a (A) MG (5; 50 ou 500 μM), (B) FC (1; 10 ou 100 μM), (C) LPS (0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) ou (D) STZ (2,5; 25 ou 250 μM) por 24 h em DMEM sem SFB e ao final da incubação a atividade da GS foi medida. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão de pelo menos quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, assumindo $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

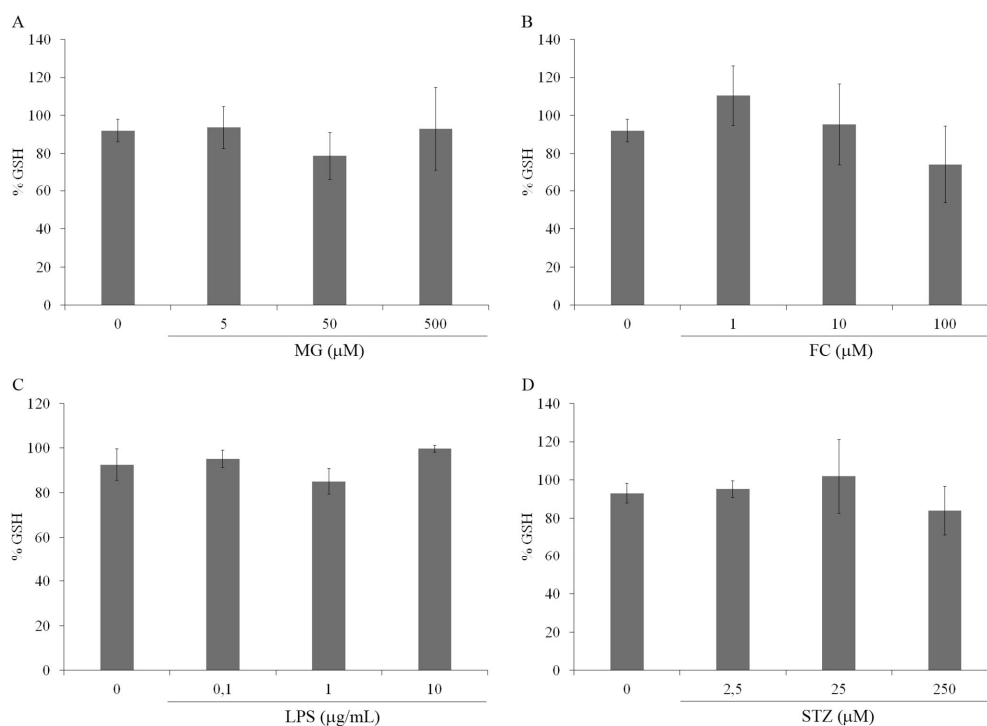


Figura 6: Efeito do MG, FC, LPS e STZ no conteúdo de GSH. A cultura primária de astrócitos foi exposta a (A) MG (5; 50 ou 500 μM), (B) FC (1; 10 ou 100 μM), (C) LPS (0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) ou (D) STZ (2,5; 25 ou 250 μM) por 24 h em DMEM sem SFB e ao final da incubação o conteúdo de GSH foi medido. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão de pelo menos quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, assumindo $p < 0,05$.

4.4. Efeito do MG, FC, LPS ou STZ sobre o imunoc conteúdo do peptídeo βA e das enzimas NEP e IDE

Com base nos resultados anteriores, as concentrações mais altas que foram testadas para cada insulto foram escolhidas para a avaliação do processamento amiloide. O imunoc conteúdo de βA foi aumentado apenas pela exposição a STZ (Figura 7A e 7D). Já o imunoc conteúdo da enzima IDE foi diminuído pelo LPS e pela STZ (Figura 7B e 7D). Nenhum composto foi capaz de alterar o imunoc conteúdo de NEP (Figura 7C e 7D).

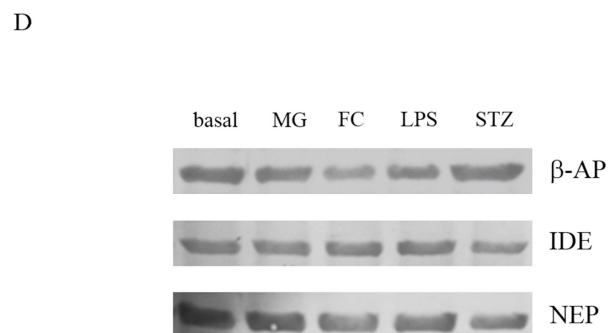
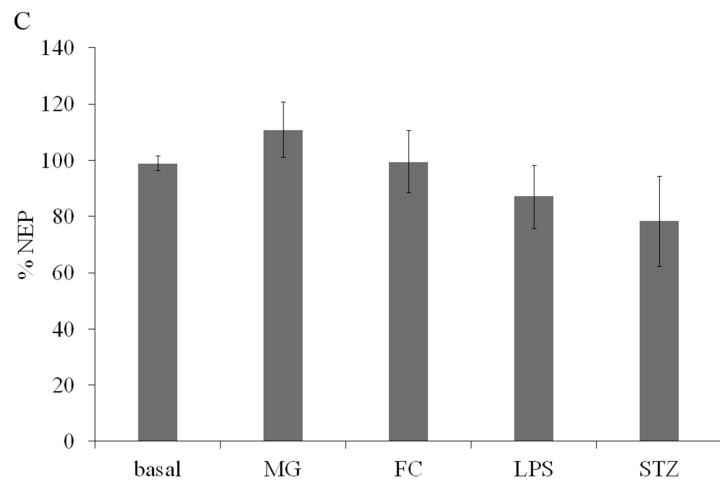
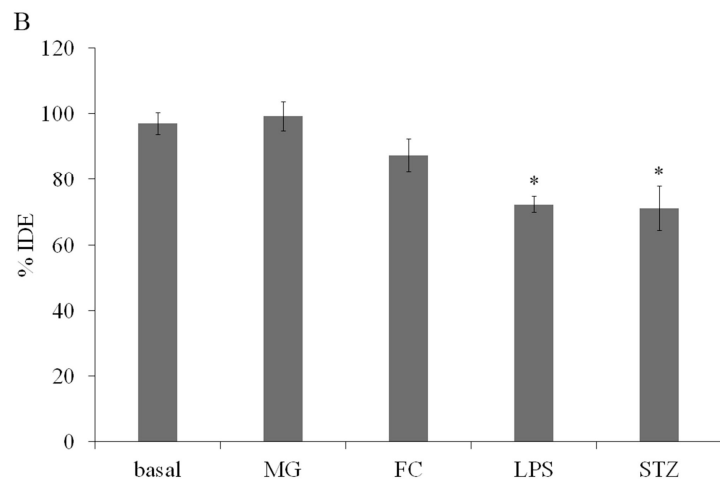
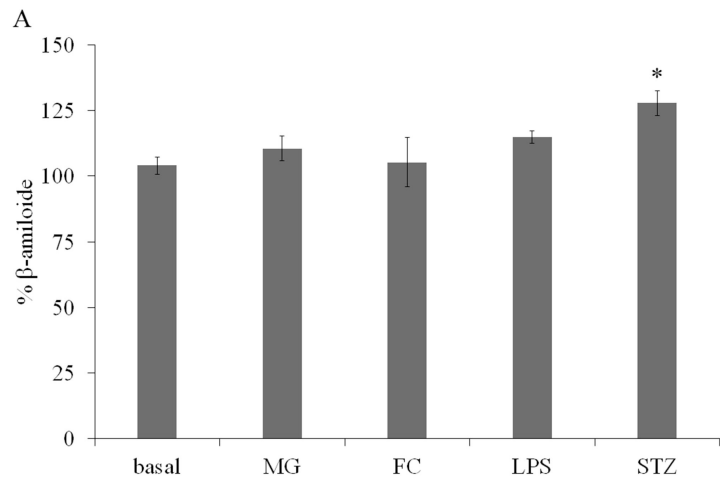


Figura 7: Efeito do MG, FC, LPS e STZ no imunoconteúdo do peptídeo β A e das enzimas NEP e IDE. A cultura primária de astrócitos foi exposta a MG, FC, LPS ou STZ (500 μ M, 100 μ M, 10 μ g/mL e 250 μ M, respectivamente) por 24 h em DMEM sem SFB. Ao final da incubação, o imunoconteúdo de β A (A), IDE (B) e NEP (C) foram medidos. (D) imagem representativa das bandas. Os resultados foram normalizados pela densidade óptica da proteína total medida pela coloração índia ink e estão expressos em porcentagem relativa ao basal como a média \pm erro padrão de pelo menos cinco experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. * indica diferença do basal considerando um $p < 0,05$

5. Discussão

5.1. Parâmetros Astrocíticos

A DA é comumente diagnosticada em seus estágios mais avançados, onde os sintomas já se apresentam de forma grave. Entretanto, alguns estudos mostram que os astrócitos já apresentam disfunções nos estágios pré-clínicos da doença (Leclerc and Abulrob 2013). Muitos estudos relacionam o início do desenvolvimento da doença com a presença de outras patologias, como DMT2 (Biessels, Koffeman et al. 2006, Kandimalla, Thirumala et al. 2017, Ninomiya 2019), ou disfunções (Zetterberg and Mattsson 2014), como, hipometabolismo de glicose (Chen and Zhong 2013), neuroinflamação (Halliday, Robinson et al. 2000, Zhao, O'Connor et al. 2011), e aumento da deposição do peptídeo β A (Serý, Povová et al. 2013, Zetterberg and Mattsson 2014). Dessa forma se faz necessário entender melhor o papel dos astrócitos no desenvolvimento da DA, e a sua relação com fatores iniciais da doença.

Neste trabalho, os compostos MG, FC e LPS foram utilizados para mimetizar alguns dos fatores relacionados ao desenvolvimento da DA: DMT2, hipometabolismo de glicose e neuroinflamação, respectivamente. Também foi usada a STZ por ser um agente capaz de induzir alterações características da DA em modelos *in vivo* (Rodrigues, Biasibetti et al. 2009) e *in vitro* (Rajasekar, Dwivedi et al. 2014).

Estudos usando MG em cultura de astrócitos e em animais já mostraram que este composto é capaz de alterar o metabolismo do glutamato através da diminuição da

sua captação, sem alterar a atividade da GS e o conteúdo de GSH (Hansen, Galland et al. 2017), além de também causar a diminuição da secreção de S100B (Hansen, Battú et al. 2016), mostrando a toxicidade do MG.

O FC apesar de ser bastante usado em modelos de hipometabolismo energético em astrócitos (Swanson and Graham 1994, Lian and Stringer 2004, Zhang, Shen et al. 2019), não tem todos os seus efeitos celulares bem caracterizados e poucos trabalhos exploram seus efeitos diretos nos astrócitos. Entretanto, já foi mostrado que, em animais, a injeção intracortical durante dois dias de 2 nmol de FC diminui o conteúdo de GFAP (Hayakawa, Nakano et al. 2010) e que a captação de glutamato diminui com a exposição de culturas de astrócitos a FC 0,24 mmol/L durante 2 e 3 horas (Voloboueva, Suh et al. 2007).

Resultados anteriores do grupo mostraram que o LPS em cultura de astrócitos em concentrações entre 0,01 e 10 µg/mL diminui a secreção de S100B, sem alterar o seu conteúdo intracelular, aumenta GFAP e diminui GSH (Guerra, Tortorelli et al. 2011).

Estudos com STZ em modelos animais mostram que este composto aumenta o conteúdo de S100B, não altera GFAP e diminui o conteúdo de GSH no hipocampo (Rodrigues, Biasibetti et al. 2009). Também já foi mostrado que esse composto diminui a atividade da GS e não altera a captação de glutamato (Tramontina, Wartchow et al. 2011). *In vitro*, a STZ aumentou a GFAP em linha de células C6 (Rajasekar, Dwivedi et al. 2014), porém pouco se sabe sobre seus efeitos isoladamente sobre os astrócitos.

Nossos dados mostram que a secreção de S100B e o conteúdo de GFAP foram alterados por todos os compostos em diferentes concentrações, sem alterar a viabilidade ou a integridade celular. Essas duas proteínas marcadoras de astrócitos

são amplamente estudadas em disfunções dessas células (Cristóvão and Gomes 2019, Escartin, Guillemaud et al. 2019). A S100B pode atuar como uma proteína trófica ou tóxica. Neste trabalho, todos os compostos avaliados causaram diminuição da secreção desta proteína e pra todos os compostos foi encontrado um aumento de GFAP, evidenciando um aumento da reatividade astrocítica, evento que pode ser considerado uma resposta a fatores deletérios. Em conjunto esses resultados mostram que os insultos foram capazes de causar uma disfunção dos astrócitos.

Os astrócitos atuam também no metabolismo glutamatérgico, uma vez que estas células captam o glutamato da fenda sináptica pode ocorrer a formação de glutamina, através da ação da enzima GS ou a formação de GSH (McKenna 2007). Interessantemente, o MG, FC, LPS e STZ causaram um aumento da atividade da GS, alteração não comumente encontrada em doenças neurodegenerativas, como a DA, onde a expressão e a atividade desta enzima costumam estar diminuídas (Jayakumar and Norenberg 2016). Resultados em andamento, ainda, sugerem que o conteúdo de GSH não é alterado por nenhum dos insultos, mas para compreender melhor a influência dos agentes estudados sobre o metabolismo do glutamato seria necessário avaliar a captação desta molécula pelos astrócitos. Resultados da literatura mostram que o MG (Hansen, Galland et al. 2017) e o FC (Voloboueva, Suh et al. 2007) são capazes de diminuir a captação de glutamato pelos astrócitos, reforçando seu efeito tóxico sobre essas células. Para melhor entender o aumento da atividade da GS encontrado, mais estudo são necessários, com relação a captação de glutamato e outros destinos desse aminoácido e da glutamina nos astrócitos.

Dessa forma, na avaliação de parâmetros astrocíticos os quatro compostos, ainda que apresentem mecanismos de ação distintos, parecem atuar de forma semelhante,

sugerindo que talvez compartilhem alguns mecanismos no desenvolvimento do dano astrocítico como os envolvidos nas doenças neurodegenerativas.

5.2. Processamento amiloide

Os astrócitos também desempenham um importante papel na depuração do peptídeo β A. Enzimas como NEP e IDE, já foram descritas como participantes tanto no aumento como na diminuição da deposição de β A, pela influência de diferentes agentes (Jha, Jha et al. 2015). Por isso é importante entender se fatores iniciais da DA atuam sobre essas enzimas de degradação do peptídeo β A em astrócitos, podendo contribuir para o aumento de sua deposição e conseqüentemente o desenvolvimento da doença.

Vários estudos vêm mostrando que cérebros de pacientes com DA apresentam mRNA e conteúdo de NEP e IDE reduzido (Miners, Barua et al. 2011). Em modelos animais, diferentes compostos têm conseguido regular estas enzimas, por meio de aumento ou diminuição de sua expressão, conteúdo ou atividade. Em condições de hipóxia a NEP teve a expressão protéica, de mRNA e atividade diminuídas em culturas de neuroblastoma, já em astrócitos a hipóxia aumentou mRNA de NEP (Fisk, Nalivaeva et al. 2007). Estudos com leptina mostraram uma diminuição na expressão de NEP, mas não de IDE em culturas primárias de astrócitos (Yamamoto, Tanida et al. 2014). A Epigallocatequina em linhagens celulares M146L aumenta a expressão de NEP e diminui o acúmulo de β A (Chang, Rong et al. 2015), porém, em culturas de astrócitos, esse composto diminuiu conteúdo intracelular e aumentou o conteúdo extracelular de NEP, sem alterar o de IDE. Além disso, também aumentou a degradação de β A no espaço extracelular astrócitos (Yamamoto, Shibata et al. 2017). Alguns estudos com estatinas foram capazes de modular essas enzimas em culturas de astrócitos, a simvastatina aumentou a secreção de IDE, mas não de NEP, e

também aumentou a degradação extracelular de β A (Son, Cha et al. 2016), porém em outro trabalho, sinvastatina e atorvastatina diminuíram conteúdo intracelular e aumentaram o conteúdo extracelular de NEP, mas não alteraram de IDE (Yamamoto, Fujii et al. 2016). Esses resultados são bastante controversos, mas em sua maioria são efeitos de compostos considerados protetores para os astrócitos e em muitos trabalhos em condições basais, ou seja, sem nenhum estímulo tóxico. Esses fatores podem contribuir para essa diversidade resultados. Por outro lado, poucos estudos testaram o efeito de agentes responsáveis por causar dano astrocíticos e mimetizar condições encontradas no início das doenças neurodegenerativas sobre essas enzimas e o peptídeo β A.

Neste trabalho, condições de glicação, hipometabolismo de glicose e neuroinflamação, encontradas em diversas doenças neurodegenerativas, foram avaliados. O LPS foi capaz de diminuir o conteúdo da enzima IDE, sugerindo que condições inflamatórias podem atuar na DA através deste mecanismo. Já é bem descrito na literatura que a neuroinflamação está associada à neurodegeneração, com destaque para a DA que pode ter seu desenvolvimento acelerado por esta condição (Asti and Gioglio 2014, Brown 2019). Muitos trabalhos mostram que a presença da endotoxina bacteriana LPS causa prejuízo de memória em roedores e altera o processamento amiloide através do aumento dos níveis de APP e β A (Lee, Lee et al. 2008), além de causar a da hiperfosforilação da tau (Gardner, White et al. 2016, Wang, Wu et al. 2018). É proposto que o LPS atue desta forma pelo aumento da liberação de citocinas, mediados por NF κ B após interagir com receptor TLR4 (Zhan, Stamova et al. 2018). Aqui, mostramos que o LPS também atua sobre a enzima IDE em astrócitos, podendo este efeito estar associado a sua participação no desenvolvimento da DA.

Os mecanismos pelo qual a STZ leva ao desenvolvimento de alterações características da DA ainda não é totalmente entendido, porém já foi proposto que este composto possa entrar em neurônios e astrócitos através do transportador de glicose 2 (GLUT2), este composto também parece afetar o receptor de insulina (IR), levando a um comprometimento da via da glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), que atua na regulação do peptídeo β A e fosforilação da tau (Rodrigues 2011)

Em estudo com linhagens C6 foi mostrado que a STZ diminui a expressão protéica e gênica do IR, compromete a fosforilação de IRS-1, AKT e GSK-3 α e GSK-3 β , e também causa diminuição das proteínas amiloidogênicas APP, BACE-1 e β A₁₋₄₂ (Rajasekar, Dwivedi et al. 2014). Neste trabalho a exposição à STZ aumentou o conteúdo de β A e diminuiu o de IDE, sugerindo que o aumento do conteúdo de peptídeo β A neste modelo também pode estar ocorrendo devido a diminuição da IDE, o que estaria prejudicando a degradação do peptídeo e contribuindo para o seu acúmulo e conseqüentemente o desenvolvimento da DA. A exposição a FC e MG não ocasionou nenhum tipo de alteração no processamento amiloide.

A exposição a MG, FC, LPS e STZ, levou a resultados semelhantes quando avaliados parâmetros astrocíticos (Figura 8A), porém na avaliação do processamento amiloide essa semelhança não se repetiu (Figura 8B). As condições de glicação e prejuízo metabólico impostas ao astrócitos parecem não estar relacionadas ao desenvolvimento de características específicas da DA através da alteração da expressão protéica das enzimas de degradação do peptídeo β A, bem como não são suficientes para gerar um aumento da produção do β A. Já em condição de neuroinflamação, induzida por LPS a via de degradação do peptídeo através da enzima IDE é afetada, mas não parece ser suficiente para causar o aumento de β A. E

por fim, a STZ parece influenciar também a degradação do β A, podendo este efeito estar envolvido no seu mecanismo desenvolvimento da DA.

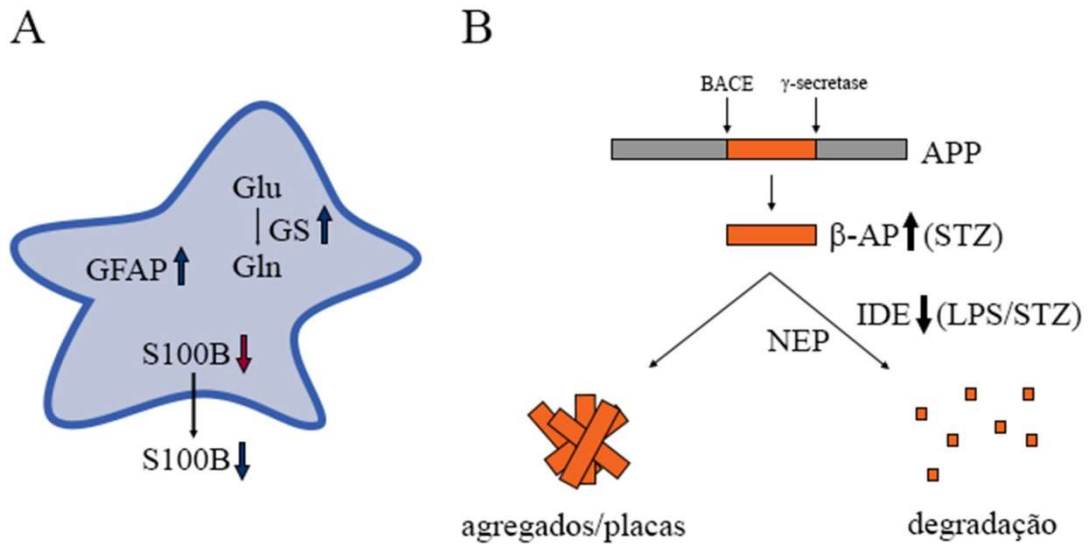


Figura 8: Resumo dos resultados. Os compostos MG, FC, LPS e STZ, tiveram seus efeitos avaliados em parâmetros astrocíticos e no processamento amiloide. Em (A), a secreção de S100B, o conteúdo de GFAP e a atividade da GS apresentaram resultados semelhantes para todos os compostos testados, enquanto apenas a STZ alterou o conteúdo de S100B. Setas azuis representam todos os compostos e seta vermelha representa STZ. Em (B), o processamento amiloide o imunocônteuo de β A foi alterado apenas pela STZ, o de IDE por STZ e LPS e o de NEP não foi alterado.

Mais estudos são necessários para entender o papel desses insultos no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, bem como a participação dos astrócitos nestes mecanismos, avaliando outros parâmetros, como a captação de glutamato e o conteúdo de glutathiona. Para compreender melhor a ação desses insultos sobre o desenvolvimento da DA também seria necessários estudos sobre a secreção e atividade das enzimas de degradação, bem como de outras proteínas envolvidas na amiloidogênese. Além disso, uma vez que todos os compostos foram capazes de alterar os parâmetros astrocíticos, mas apenas LPS e STZ foram capazes de modular o processamento amiloide, se torna de grande importância um estudo relacionando

essas alterações com o depósito amiloide. Considerando nossos resultados, não podemos descartar a possibilidade das alterações de S100B, GFAP e GS precederem o aumento do peptídeo β A e nos insultos com MG e FC não houve tempo de incubação ou concentração suficiente para desencadear essa alteração.

6. Conclusão

Todos os insultos testados foram capazes, em diferentes concentrações, de diminuir a secreção da proteína S100B e aumentar o conteúdo de GFAP nas culturas de astrócitos. Isso mostra que esses diferentes tipos de insultos (glicante, inflamatório e metabólico) podem ter efeitos similares em astrócitos. Entretanto, uma vez que os astrócitos parecem ter um importante papel no início dessas patologias, esses resultados indicam que os diferentes tipos de insultos podem ter mecanismos similares de dano, que podem, portanto, serem alvos de estudo na tentativa de se descobrir novos marcadores e terapias para essas patologias. Por outro lado, apenas o insulto inflamatório e com STZ foram capazes de alterar o processamento amiloide, indicando uma maior especificidade para a utilização como modelo *in vitro* da DA.

7. Perspectivas

- Finalizar a avaliação do conteúdo de GSH;
- Avaliar a captação de glutamato e de glicose;
- Avaliar o conteúdo extracelular das enzimas NEP e IDE;
- Avaliar o conteúdo de APP.

8. Apoio financeiro

Esse trabalho foi realizado com apoio financeiro da CAPES, CNPq e Fapergs.

9. Referências bibliográficas

Angeloni, C., L. Zambonin and S. Hrelia (2014). "Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease." Biomed Res Int**2014**: 238485.

Asti, A. and L. Gioglio (2014). "Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation?" J Alzheimers Dis**39**(1): 169-179.

Bayes-Genis, A., J. Barallat and A. M. Richards (2016). "A Test in Context: Neprilysin: Function, Inhibition, and Biomarker." J Am Coll Cardiol**68**(6): 639-653.

Belyaev, N. D., N. N. Nalivaeva, N. Z. Makova and A. J. Turner (2009). "Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease." EMBO Rep**10**(1): 94-100.

Ben Haim, L., M. A. Carrillo-de Sauvage, K. Ceyzériat and C. Escartin (2015). "Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases." Front Cell Neurosci**9**: 278.

Biessels, G. J., A. Koffeman and P. Scheltens (2006). "Diabetes and cognitive impairment. Clinical diagnosis and brain imaging in patients attending a memory clinic." J Neurol**253**(4): 477-482.

Biessels, G. J., L. P. van der Heide, A. Kamal, R. L. Bleys and W. H. Gispen (2002). "Ageing and diabetes: implications for brain function." Eur J Pharmacol**441**(1-2): 1-14.

Birch, A. M. (2014). "The contribution of astrocytes to Alzheimer's disease." Biochem Soc Trans**42**(5): 1316-1320.

Bronzuoli, M. R., A. Iacomino, L. Steardo and C. Scuderi (2016). "Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease." J Inflamm Res**9**: 199-208.

Brown, G. C. (2019). "The endotoxin hypothesis of neurodegeneration." J Neuroinflammation**16**(1): 180.

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

Chang, X., C. Rong, Y. Chen, C. Yang, Q. Hu, Y. Mo, C. Zhang, X. Gu, L. Zhang, W. He, S. Cheng, X. Hou, R. Su, S. Liu, W. Dun, Q. Wang and S. Fang (2015). "(-)-Epigallocatechin-3-gallate attenuates cognitive deterioration in Alzheimer's disease model mice by upregulating neprilysin expression." Exp Cell Res**334**(1): 136-145.

Chen, Z. and C. Zhong (2013). "Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies." Prog Neurobiol**108**: 21-43.

Chu, J. M., D. K. Lee, D. P. Wong, R. N. Wong, K. K. Yung, C. H. Cheng and K. K. Yue (2014). "Ginsenosides attenuate methylglyoxal-induced impairment of insulin signaling and subsequent apoptosis in primary astrocytes." Neuropharmacology**85**: 215-223.

Craft, S. (2007). "Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment." Curr Alzheimer Res**4**(2): 147-152.

Crane, P. K., R. Walker, R. A. Hubbard, G. Li, D. M. Nathan, H. Zheng, S. Haneuse, S. Craft, T. J. Montine, S. E. Kahn, W. McCormick, S. M. McCurry, J. D. Bowen and E. B. Larson (2013). "Glucose levels and risk of dementia." N Engl J Med**369**(6): 540-548.

Cristóvão, J. S. and C. M. Gomes (2019). "S100 Proteins in Alzheimer's Disease." Front Neurosci**13**: 463.

Domínguez-Prieto, M., A. Velasco, A. Taberner and J. M. Medina (2018). "Endocytosis and Transcytosis of Amyloid- β Peptides by Astrocytes: A Possible Mechanism for Amyloid- β Clearance in Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis**65**(4): 1109-1124.

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.

Dorfman, V. B., L. Pasquini, M. Riudavets, J. J. López-Costa, A. Villegas, J. C. Troncoso, F. Lopera, E. M. Castaño and L. Morelli (2010). "Differential cerebral deposition of IDE and NEP in sporadic and familial Alzheimer's disease." Neurobiol Aging**31**(10): 1743-1757.

Escartin, C., O. Guillemaud and M. A. Carrillo-de Sauvage (2019). "Questions and (some) answers on reactive astrocytes." Glia**67**(12): 2221-2247.

Farris, W., S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E. A. Eckman, M. P. Frosch, C. B. Eckman, R. E. Tanzi, D. J. Selkoe and S. Guenette (2003). "Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A**100**(7): 4162-4167.

Fisk, L., N. N. Nalivaeva, J. P. Boyle, C. S. Peers and A. J. Turner (2007). "Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes." Neurochem Res**32**(10): 1741-1748.

Fița, I. G., A. M. Enciu and B. P. Stănoiu (2011). "New insights on Alzheimer's disease diagnostic." Rom J Morphol Embryol**52**(3 Suppl): 975-979.

Frost, G. R. and Y. M. Li (2017). "The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease." Open Biol**7**(12).

Gardner, L. E., J. D. White, M. J. Eimerbrink, G. W. Boehm and M. J. Chumley (2016). "Imatinib methanesulfonate reduces hyperphosphorylation of tau following repeated peripheral exposure to lipopolysaccharide." Neuroscience**331**: 72-77.

Gottfried, C., L. Valentim, C. Salbego, J. Karl, S. T. Wofchuk and R. Rodnigt (1999). "Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27)." Brain Res**833**(2): 142-149.

Guerra, M. C., L. S. Tortorelli, F. Galland, C. Da Ré, E. Negri, D. S. Engelke, L. Rodrigues, M. C. Leite and C. A. Gonçalves (2011). "Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats." J Neuroinflammation**8**: 128.

Halliday, G., S. R. Robinson, C. Shepherd and J. Kril (2000). "Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms." Clin Exp Pharmacol Physiol**27**(1-2): 1-8.

Hansen, F., C. E. Battú, M. F. Dutra, F. Galland, F. Lirio, N. Broetto, P. Nardin and C. A. Gonçalves (2016). "Methylglyoxal and carboxyethyllysine reduce glutamate uptake and S100B secretion in the hippocampus independently of RAGE activation." Amino Acids**48**(2): 375-385.

Hansen, F., D. F. de Souza, S. a. L. Silveira, A. L. Hoefel, J. B. Fontoura, A. C. Tramontina, L. D. Bobermin, M. C. Leite, M. L. Perry and C. A. Gonçalves (2012). "Methylglyoxal alters glucose metabolism and increases AGEs content in C6 glioma cells." Metab Brain Dis**27**(4): 531-539.

Hansen, F., F. Galland, F. Lirio, D. F. de Souza, C. Da Ré, R. F. Pacheco, A. F. Vizuete, A. Quincozes-Santos, M. C. Leite and C. A. Gonçalves (2017). "Methylglyoxal Induces Changes in the Glyoxalase System and Impairs Glutamate Uptake Activity in Primary Astrocytes." Oxid Med Cell Longev**2017**: 9574201.

Haus-Wegrzyniak, B., P. Dobrzanski, J. D. Stoehr and G. L. Wenk (1998). "Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease." Brain Res**780**(2): 294-303.

Hayakawa, K., T. Nakano, K. Irie, S. Higuchi, M. Fujioka, K. Orito, K. Iwasaki, G. Jin, E. H. Lo, K. Mishima and M. Fujiwara (2010). "Inhibition of reactive astrocytes with

fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice." J Cereb Blood Flow Metab**30**(4): 871-882.

Heimfarth, L., S. O. Loureiro, P. Pierozan, B. O. de Lima, K. P. Reis, E. B. Torres and R. Pessoa-Pureur (2013). "Methylglyoxal-induced cytotoxicity in neonatal rat brain: a role for oxidative stress and MAP kinases." Metab Brain Dis**28**(3): 429-438.

Hellström-Lindahl, E., R. Ravid and A. Nordberg (2008). "Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A beta levels." Neurobiol Aging**29**(2): 210-221.

Iwata, N., S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H. J. Lee and T. C. Saido (2001). "Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin." Science**292**(5521): 1550-1552.

Jayakumar, A. R. and M. D. Norenberg (2016). "Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders." Adv Neurobiol**13**: 327-350.

Jha, N. K., S. K. Jha, D. Kumar, N. Kejriwal, R. Sharma, R. K. Ambasta and P. Kumar (2015). "Impact of Insulin Degrading Enzyme and Neprilysin in Alzheimer's Disease Biology: Characterization of Putative Cognates for Therapeutic Applications." J Alzheimers Dis**48**(4): 891-917.

Kandimalla, R., V. Thirumala and P. H. Reddy (2017). "Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal." Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**1863**(5): 1078-1089.

Khandelwal, P. J., A. M. Herman and C. E. Moussa (2011). "Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology." J Neuroimmunol**238**(1-2): 1-11.

Kuhla, B., H. J. Lüth, D. Haferburg, K. Boeck, T. Arendt and G. Münch (2005). "Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci**1043**: 211-216.

Lapolla, A., P. Traldi and D. Fedele (2005). "Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins." Clin Biochem**38**(2): 103-115.

Leclerc, B. and A. Abulrob (2013). "Perspectives in molecular imaging using staging biomarkers and immunotherapies in Alzheimer's disease." ScientificWorldJournal**2013**: 589308.

Lee, J. W., Y. K. Lee, D. Y. Yuk, D. Y. Choi, S. B. Ban, K. W. Oh and J. T. Hong (2008). "Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation." J Neuroinflammation**5**: 37.

Leite, M. C., F. Galland, D. F. de Souza, M. C. Guerra, L. Bobermin, R. Biasibetti, C. Gottfried and C. A. Gonçalves (2009). "Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices." J Neurosci Res**87**(11): 2439-2446.

Li, K., J. Li, J. Zheng and S. Qin (2019). "Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases." Aging Dis**10**(3): 664-675.

Lian, X. Y. and J. L. Stringer (2004). "Inhibition of aconitase in astrocytes increases the sensitivity to chemical convulsants." Epilepsy Res**60**(1): 41-52.

Long, J. M. and D. M. Holtzman (2019). "Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies." Cell**179**(2): 312-339.

McKenna, M. C. (2007). "The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain." J Neurosci Res**85**(15): 3347-3358.

Miners, J. S., N. Barua, P. G. Kehoe, S. Gill and S. Love (2011). "A β -degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol**170**(11): 944-959.

Minet, R., F. Villie, M. Marcollet, D. Meynial-Denis and L. Cynober (1997). "Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay." Clin Chim Acta**268**(1-2): 121-132.

- Mosconi, L., A. Pupi and M. J. De Leon (2008). "Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci**1147**: 180-195.
- Nalivaeva, N. N. (2015). "Role of amyloid precursor protein (APP) in regulation of neuronal genes." Springerplus**4**(Suppl 1): L40.
- Nalivaeva, N. N. and A. J. Turner (2019). "Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy." Br J Pharmacol**176**(18): 3447-3463.
- Ninomiya, T. (2019). "Epidemiological Evidence of the Relationship Between Diabetes and Dementia." Adv Exp Med Biol**1128**: 13-25.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem**83**(2): 346-356.
- Rajasekar, N., S. Dwivedi, C. Nath, K. Hanif and R. Shukla (2014). "Protection of streptozotocin induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation and amyloidogenesis in astrocytes by insulin." Neuropharmacology**86**: 337-352.
- Rajasekar, N., C. Nath, K. Hanif and R. Shukla (2016). "Inhibitory Effect of Memantine on Streptozotocin-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Neurotrophic Factor Decline in Astrocytes." Mol Neurobiol**53**(10): 6730-6744.
- Ries, M. and M. Sastre (2016). "Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells." Front Aging Neurosci**8**: 160.
- Rodrigues, L. (2011). Hippocampal Alterations in Rats Submitted to Streptozotocin-Induced Dementia Model: Neuroprotection with Aminoguanidine R. Biasibetti, A. Swarowsky, M. C. Leite et al. Handbook of Animal Models in Alzheimer's Disease, G. Casadesus: 14.
- Rodrigues, L., R. Biasibetti, A. Swarowsky, M. C. Leite, A. Quincozes-Santos, J. A. Quilfeldt, M. Achaval and C. A. Gonçalves (2009). "Hippocampal alterations in rats

submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine." J Alzheimers Dis**17**(1): 193-202.

Rodriguez-Arellano, J. J., V. Parpura, R. Zorec and A. Verkhratsky (2016). "Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease." Neuroscience**323**: 170-182.

Serý, O., J. Povová, I. Míšek, L. Pešák and V. Janout (2013). "Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review." Folia Neuropathol**51**(1): 1-9.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol**119**(1): 7-35.

Son, S. M., M. Y. Cha, H. Choi, S. Kang, M. S. Lee, S. A. Park and I. Mook-Jung (2016). "Insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes is mediated by an autophagy-based unconventional secretory pathway in Alzheimer disease." Autophagy**12**(5): 784-800.

Soria Lopez, J. A., H. M. González and G. C. Léger (2019). "Alzheimer's disease." Handb Clin Neurol**167**: 231-255.

Swanson, R. A. and S. H. Graham (1994). "Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro." Brain Res**664**(1-2): 94-100.

Taipa, R., J. Pinho and M. Melo-Pires (2012). "Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias." Front Neurol**3**: 68.

Thal, D. R. (2012). "The role of astrocytes in amyloid β -protein toxicity and clearance." Exp Neurol**236**(1): 1-5.

Thambisetty, M., Y. An and T. Tanaka (2013). "Alzheimer's disease risk genes and the age-at-onset phenotype." Neurobiol Aging**34**(11): 2696.e2691-2695.

Tramontina, A. C., K. M. Wartchow, L. Rodrigues, R. Biasibetti, A. Quincozes-Santos, L. Bobermin, F. Tramontina and C. A. Goncalves (2011). "The neuroprotective effect of

two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats." J Neural Transm (Vienna)**118**(11): 1641-1649.

Tramontina, F., M. C. Leite, K. Cereser, D. F. de Souza, A. C. Tramontina, P. Nardin, A. C. Andreazza, C. Gottfried, F. Kapczinski and C. A. Gonçalves (2007). "Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state." J Neurosci Methods**162**(1-2): 282-286.

Voloboueva, L. A., S. W. Suh, R. A. Swanson and R. G. Giffard (2007). "Inhibition of mitochondrial function in astrocytes: implications for neuroprotection." J Neurochem**102**(4): 1383-1394.

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

Wang, L. M., Q. Wu, R. A. Kirk, K. P. Horn, A. H. Ebada Salem, J. M. Hoffman, J. T. Yap, J. A. Sonnen, R. A. Towner, F. A. Bozza, R. S. Rodrigues and K. A. Morton (2018). "Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid- β and p-tau formation in the rat brain." Am J Nucl Med Mol Imaging**8**(2): 86-99.

Wyss-Coray, T., J. D. Loike, T. C. Brionne, E. Lu, R. Anankov, F. Yan, S. C. Silverstein and J. Husemann (2003). "Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ." Nat Med**9**(4): 453-457.

Yamamoto, N., H. Arima, K. Naruse, R. Kasahara, H. Taniura, H. Hirate, T. Sugiura, K. Suzuki and K. Sobue (2013). "Ketamine reduces amyloid β -protein degradation by suppressing neprilysin expression in primary cultured astrocytes." Neurosci Lett**545**: 54-58.

Yamamoto, N., Y. Fujii, R. Kasahara, M. Tanida, K. Ohora, Y. Ono, K. Suzuki and K. Sobue (2016). "Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid β -protein degradation in

extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways." Glia**64**(6): 952-962.

Yamamoto, N., R. Ishikuro, M. Tanida, K. Suzuki, Y. Ikeda-Matsuo and K. Sobue (2018). "Insulin-signaling Pathway Regulates the Degradation of Amyloid β -protein via Astrocytes." Neuroscience**385**: 227-236.

Yamamoto, N., M. Shibata, R. Ishikuro, M. Tanida, Y. Taniguchi, Y. Ikeda-Matsuo and K. Sobue (2017). "Epigallocatechin gallate induces extracellular degradation of amyloid β -protein by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of ERK and PI3K pathways." Neuroscience**362**: 70-78.

Yamamoto, N., M. Tanida, Y. Ono, R. Kasahara, Y. Fujii, K. Ohora, K. Suzuki and K. Sobue (2014). "Leptin inhibits amyloid β -protein degradation through decrease of neprilysin expression in primary cultured astrocytes." Biochem Biophys Res Commun**445**(1): 214-217.

Zetterberg, H. and N. Mattsson (2014). "Understanding the cause of sporadic Alzheimer's disease." Expert Rev Neurother**14**(6): 621-630.

Zhan, X., B. Stamova and F. R. Sharp (2018). "Lipopolysaccharide Associates with Amyloid Plaques, Neurons and Oligodendrocytes in Alzheimer's Disease Brain: A Review." Front Aging Neurosci**10**: 42.

Zhang, X., X. Shen, J. Dong, W. C. Liu, M. Song, Y. Sun, H. Shu, C. L. Towse, W. Liu, C. F. Liu and X. Jin (2019). "Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Ameliorates Learning and Memory Impairment Through Upregulating CRTAC1 and Synaptophysin in Ischemic Stroke Rats." Cell Mol Neurobiol**39**(8): 1151-1163.

Zhao, J., T. O'Connor and R. Vassar (2011). "The contribution of activated astrocytes to A β production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis." J Neuroinflammation**8**: 150.