

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

Leonardo Menezes

**AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASTROGLIAIS AQUAPORINA-4, CONEXINA-43 E
Kir4.1 EM UM MODELO DE DEMÊNCIA INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

Porto Alegre

2020

Leonardo Menezes

**AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASTROGLIAIS AQUAPORINA-4, CONEXINA-43 E
Kir4.1 EM UM MODELO DE DEMÊNCIA INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Menezes, Leonardo
AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASTROGLIAIS AQUAPORINA-4,
CONEXINA-43 E Kir4.1 EM UM MODELO DE DEMÊNCIA INDUZIDO
POR ESTREPTOZOTOCINA / Leonardo Menezes. -- 2020.
59 f.
Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

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. Estreptozotocina. 3.
Proteínas astrogliais. 4. Marcadores astrogliais. I.
Saraiva Gonçalves, Carlos Alberto, orient. II.
Título.

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

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.”

- Marie Curie

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Jossami Moraes Menezes, pelo apoio incondicional durante todos os meus anos de vida acadêmica, pelo suporte, amor e carinho demonstrados sempre, pelas batalhas diárias e esforços em sempre ajudar-me com necessário e além.

À Bruna Schultz, por todo companheirismo durante a realização deste trabalho, tanto nos momentos iniciais à seleção quanto ao longo do desenvolvimento deste.

Às amigas, Inaiá Oliveira da Rocha e Silvia Bernardy, que mesmo com a distância nossa amizade e companheirismo não foi modificado.

À Valeria Frank do Nascimento, pelas diversas horas trocando mensagens comigo, sendo a melhor pessoa do mundo nas minhas horas de desabafo e choro.

À Taisa Rosa, por ser a melhor amiga do mundo e por estar sempre disposta a me ouvir, em qualquer lugar e a qualquer hora.

Ao prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, por ser a pessoa incrível que é, por ter-me aceitado em seu laboratório de uma hora para outra, quase que literalmente. Por todo o apoio durante a realização deste trabalho, por todos os ensinamentos e pelos momentos de descontração.

À Lilian, por ser praticamente minha coorientadora e ter me dado todo o suporte necessário, tanto de bancada quanto teórico, esse último mesmo estando em outro continente. Pela paciência e preocupação em sempre fazer seu melhor para ajudar o outro.

À Letícia Rodrigues, vulgo Lets, por também ser um membro do laboratório que sempre esteve disposto a ajudar. Por todo o conhecimento trocado e toda as ajudas realizadas.

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

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	4
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 ENVELHECIMENTO E DEMÊNCIA	6
1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER	8
1.3 ASTÓCITOS E DOENÇA DE ALZHEIMER	9
1.3.1 Canais de potássio	13
1.4 MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
PARTE II	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 ANIMAIS	18
3.2 INDUÇÃO DO MODELO	19
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	20
3.4 TESTE COMPORTAMENTAL	21
3.5 EUTANÁSIA, OBTENÇÃO DO LCR, HIPOCAMPO E SORO	22
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	23

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	24
3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	24
3.9 TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE	25
3.10 IMUNODETECÇÃO.....	26
3.11 DOSAGEM DE ALBUMINA NO LCR.....	27
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 AVALIAÇÃO COGNITIVA.....	28
4.2 IMUNOCONTEÚDO DE AQUAPORINA-4, CONEXINA-43 E Kir4.1.....	29
4.2.1 Aquaporina-4 (AQP4).....	29
4.2.2 Conexina-43 (Cx-43).....	30
4.2.3 Kir4.1	31
4.3 DOSAGEM DE ALBUMINA NO LCR.....	32
PARTE III	33
5 DISCUSSÃO	34
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS.....	42
LISTA DE FIGURAS.....	52
LISTA DE EQUAÇÕES	52
LISTA DE TABELAS	52

PARTE I

RESUMO

O envelhecimento da população mundial vem se tornando uma das transformações sociais de maior significância do século XXI. Através dos danos moleculares e celulares resultantes do envelhecimento, a demência vem se tornando a maior responsável pelos altos números de incapacidade e dependência entre idosos ao redor do mundo, o que leva a reflexos familiares, sociais, psicológicos e econômicos. A doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência. A DA tem como característica principal a perda progressiva de memória e dano às funções cognitivas. Neste trabalho, investigamos o imunoconteúdo de proteínas predominantemente astrocíticas, incluindo aquaporina-4 (AQP4), conexina-43 (Cx-43) e canal retificador interno de potássio subunidade 4.1 (Kir4.1) em um modelo da doença de Alzheimer do tipo esporádica induzido por estreptozotocina (STZ). Nosso modelo demonstrou ser capaz de mimetizar a patologia da DA, visto que encontramos déficit cognitivo através do índice de reconhecimento de objetos por performance cognitiva em todos os tempos estudados (2, 4, 8 e 16 semanas após injeção intracerebroventricular de STZ (ICV-STZ)). Neste trabalho, observamos que, a partir da quarta semana de exposição ao modelo houve uma diminuição significativa do conteúdo de Cx-43. Também, um decréscimo no conteúdo de Kir4.1 na oitava e décima sexta semana foi observado. Para a AQP4, notamos que, na quarta e oitava semana houve um aumento e uma diminuição no seu imunoconteúdo, respectivamente. Com isso, vimos a possibilidade de envolvimento das proteínas anteriormente citadas como marcadores astrogliais hipocâmpais de déficit cognitivo.

ABSTRACT

The aging of the world population is becoming one of the most significant social transformations of the 21st century. Through the molecular and cellular damage resulting from aging, dementia has become the main responsible for the high numbers of disability and dependency among elderly people around the world, which leads to family, social, psychological and economic reflexes. Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia. The main characteristic of AD is the progressive loss of memory and damage to cognitive functions. In this work, we investigated the immunocontent of astroglial proteins predominantly astrocytic proteins, including aquaporin-4 (AQP4), connexin-43 (Cx-43) and inwardly rectifying potassium channel subunit 4.1 (Kir4.1) in a model of sporadic Alzheimer's disease streptozotocin-induced (STZ). Our model proved to be able to mimic the pathology of AD, since we found cognitive deficit through the index of object recognition for cognitive performance at all times studied (2, 4, 8 and 16 weeks after intracerebroventricular injection of STZ). In this work, we observed that, from the fourth week of exposure to the model, there was a significant decrease in the content of Cx-43. Also, a decrease in the content of Kir4.1 in the eighth and sixteenth week was observed. For AQP4, we noticed that, in the fourth and eighth week, there was an increase and a decrease in its immunocontent, respectively. With that, we saw the possibility of involvement of the proteins previously mentioned as hippocampal astroglial markers of cognitive deficit.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABS - Absorvância

APP - Proteína precursora de amiloide

AQP4 – Aquaporina-4

B - Branco

β A - β -amiloide

BHE - Barreira hematoencefálica

CDK5 – Ciclina-dependente cinase 5

CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais

Cx-43 – Conexina-43

DA - Doença de Alzheimer

DA_e – Doença de Alzheimer esporádica

DA_f – Doença de Alzheimer familiar

DM – Diabetes *mellitus*

FCM – Fator de calibração médio

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

GLUT2 - Transportador de glicose do tipo II

GSK3 β – Glicogênio sintase cinase 3 β

ICV - Injeção intracerebroventricular

IP – Injeção intraperitoneal

IR – Índice de reconhecimento

K_{ir}4.1 – Canal retificador interno de potássio (K⁺)

LCR - Líquido cefalorraquidiano

NFTs – Emaranhados neurofibrilares

STZ - Estreptozotocina

PSEN1 - Presenilina 1

PSEN2 - Presenilina 2

S100B – Proteína ligante de cálcio

SNC - Sistema nervoso central

TOA – Tempo de exploração do objeto antigo

TON – Tempo de exploração do objeto novo

UNV – Unidade neurovascular

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO E DEMÊNCIA

O envelhecimento é o decurso natural e progressivo que acontece durante a vida ocorrendo em todos os organismos. Esse processo acarreta alterações dos padrões fisiológicos dos indivíduos estando relacionado mutuamente com questões sociais, culturais, biológicas e psicológicas (MENDES, et al., 2018).

O envelhecimento da população mundial vem se tornando uma das transformações sociais de maior significância do século XXI. Tais transformações surtem efeito em vários setores da sociedade moderna, tais como os mercados de trabalho e financeiro, aumento da demanda de bens e serviços incluindo habitação, transporte e segurança pública (UNITED NATIONS, 2020).

No Brasil, estima-se que até o ano de 2042 a população idosa (com idade acima de 60 anos) chegue a 57 milhões, representando uma fatia populacional equivalente a 24,5% da população total no Brasil neste mesmo ano. Para o ano de 2060, a previsão é de que o crescimento populacional tenha diminuído, chegando a 228,2 milhões de brasileiros sendo que 25,5% desse valor representará a população idosa no país (IBGE, 2020).

Do ponto de vista biológico, o envelhecimento é um processo dinâmico, progressivo e irreversível (FECHINE, TROMPIERI, 2012). Porém, o dinamismo deste não é linear, o que leva a um acúmulo de danos gradativos em nível celular e molecular no organismo e, em decorrência disso, há um decréscimo nas capacidades física e mental do indivíduo com o passar do tempo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Todos os sistemas no organismo são atingidos pela morte celular progressiva resultante do envelhecimento. No sistema cardíaco, há um espessamento da parede arterial e alterações na composição da matriz vascular; diminuição da elasticidade das vias aéreas no sistema respiratório; perda de massa renal no sistema urinário (NAVARATNARAJAH; JACKSON, 2017).

No sistema nervoso central (SNC), o envelhecimento natural do organismo leva a perda de densidade neuronal, diminuição da massa encefálica, decréscimo na produção de neurotransmissores importantes como os pertencentes às catecolaminas, serotonina e acetilcolina. Esse efeito sobre os neurotransmissores se reflete em mudanças de humor repentinas, perda de memória e efeitos negativos no sistema motor do indivíduo idoso (AMARYA; SINGH; SABHARWAL, 2018; NAVARATNARAJAH; JACKSON, 2017).

Através dos danos moleculares e celulares resultantes do envelhecimento, problemas associados a doenças neurodegenerativas podem ou não acometer o indivíduo. Nesse âmbito, a demência surge como uma síndrome crônica ou de natureza progressiva que leva a perda cognitiva, afetando as capacidades de aprendizagem, comunicação, julgamento e compreensão, também acometendo a memória (MARTIN, 2009).

A demência pode ser entendida também como um conjunto de sintomas associados às doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (ESOPENKO; LEVINE, 2015). A demência é a maior responsável pelos altos números de incapacidade e dependência entre idosos ao redor do mundo, o que leva a reflexos familiares, sociais, psicológicos e econômicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência (BALLARD et al., 2011). A DA tem como característica principal a perda progressiva de memória e dano as funções cognitivas (BATEMAN et al., 2012). Com o desenvolvimento da doença, sintomas como problemas de comunicação e localização espacial bem como mudanças comportamentais ligadas a agressividade e depressão começam a surgir (SILVA et al., 2019).

A DA pode ser dividida em dois tipos: familiar (DAf) e esporádica (DAe). A DAf, é uma doença autossômica dominante que representa menos de 5% dos casos de DA (MAYEUX; STERN, 2012). Nesse tipo da doença, são encontradas mutações em 3 genes: proteína precursora de amiloide (do inglês, *amyloid protein precursor*, APP), presenilina-1 (PSEN1) ou presenilina-2 (PSEN2). Essas mutações impactam diretamente os níveis totais de peptídeo β -amiloide (β A), bem como sua deposição formando as placas senis, características da DA (ISRAEL et al., 2012).

A DAe é classificada como sendo uma doença multifatorial, visto que possui decorrência de fatores ambientais, porém também encontrados fatores genéticos que estão relacionados com este tipo da doença (CARREIRAS et al., 2014).

Alguns fatores de risco ligados a DAe são: injúrias encefálicas atribuídas ao traumatismo craniano, diabetes *mellitus* (DM), depressão, hipertensão arterial, baixa escolaridade, fumo, entre outros (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019; CALSOLARO; EDISON, 2016; GONG; LIU; IQBAL, 2018). Os casos de DA associados ao tipo esporádico representam mais de 95% de casos totais da doença (LISTA et al., 2015).

Patologicamente, a DA é caracterizada pela presença de placas resultantes da deposição de β A e a presença de emaranhados neurofibrilares (NFTs) em decorrência da fosforilação da proteína *tau* (ROLAND; JACOBSEN, 2009).

A formação de β A ocorre devido à clivagem da APP por β e γ -secretases, que geram oligômeros e subsequentemente fibrilas insolúveis - as placas neuríticas. As placas neuríticas, no espaço interneuronal, interferem na sinalização sináptica. (DUBOIS et al., 2016; TIWARI et al., 2019).

O mecanismo de fosforilação da proteína *tau* interneuronal não é completamente conhecido, mas acredita-se que há o envolvimento do β A de forma que esse promova a ativação de cinases específicas, como por exemplo a GSK3 β (do inglês – *glycogen synthase kinase 3*) e CDK5 (do inglês – *cyclin-dependent kinase 5*) (DE STROOPER; WOODGETT, 2003).

Também existem evidências que mostram que a neuroinflamação desencadeada pelo β A promove a secreção de fatores pró-inflamatórios que estimulam a fosforilação da *tau* e reduzem a capacidade do proteossomo de realizar a degradação da proteína *tau* (BLURTON-JONES; LAFERLA, 2006).

Do ponto de vista macroscópico, a DA leva a alterações morfológicas em diversas células do SNC, incluindo neurônios e os astrócitos. Com essas alterações, as funções específicas desses tipos de células ficam prejudicadas (PALOP, 2011), os astrócitos reagem ao estímulo nocivo entrando em estado reativo para tentar reverter ou amenizar os efeitos adversos da DA (PEKNY; PEKNA, 2014).

1.3 ASTÓCITOS E DOENÇA DE ALZHEIMER

Os astrócitos são as células mais abundantes entre as células gliais, estando bem distribuídos ao longo do tecido encefálico. São células heterogêneas, ou seja,

possuem diferentes funções e formas dependentes da região em que se localizam (GONZÁLEZ-REYES et al., 2017; JÄKEL; DIMOU, 2017; PEKNY; PEKNA, 2014).

Pode-se diferenciar os astrócitos de outras células do SNC através da expressão de proteínas que servem como marcadores para esse tipo celular, dentre esses, pode-se citar a GFAP (do inglês – *glial fibrillary acidic protein*), a proteína ligante de cálcio S100B e a glutamina sintetase (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Porém, em uma situação de injúria no SNC, os astrócitos aumentam a expressão de GFAP bem como passam a expressar vimentina e nestina – outras proteínas de filamentos intermediários do citoesqueleto características de células imaturas (CARTER et al., 2019).

A GFAP é uma proteína formadora de filamentos intermediários em astrócitos, juntamente com a vimentina, a nestina e a sinemina. E o aumento de GFAP serve como marcador altamente específico em estados de reatividade astrocitária (astrogliose). Este estado ocorre, geralmente, no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas (ASSEFA; GEBRE; ALTAYE, 2018; JANY; HAGEMANN; MESSING, 2013; MIDDELDORP; HOL, 2011).

Outra proteína que serve como marcador de reatividade glial é a S100B, é uma proteína ligante de cálcio produzida e secretada pelos astrócitos. É uma proteína de estrutura homodimérica que, assim como outras ligantes de cálcio sofre uma larga mudança conformacional que expõe os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (CHAVES et al., 2010).

Essa mudança conformacional permite que a S100B tenha atividade na modulação do ciclo celular, no metabolismo energético do SNC e um papel modulador importante na neuroinflamação (GULOXSUZ et al., 2017; IRAM; FRENKEL, 2012).

Num momento de dano, os astrócitos assumem uma forma reativa, mudam os aspectos morfológicos, transcricionais, funcionais e metabólicos. Morfológicamente, assumem um estado hipertrófico e iniciam um processo de ramificação (WILHELMSSON et al., 2006), assim também mudando a expressão de GFAP e S100B (SOFRONIEW, 2010).

Fora de um ambiente patológico, os astrócitos auxiliam na sobrevivência de neurônios através de sua conexão com a circulação periférica (GORDLEEVA et al., 2012), participam da captação e reciclagem de neurotransmissores, liberação de gliotransmissores (GABA, ATP, glutamato e D-serina) (VASILE; DOSSI; ROUACH, 2017), modulação da atividade sináptica e neuroinflamação e controle da homeostase iônica (controle de íons como Na⁺, K⁺ e Cl⁻) (VASILE; DOSSI; ROUACH, 2017).

Além das funções acima citadas, os astrócitos também podem auxiliar no controle da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) através de sua extensão celular presente nos vasos sanguíneos da BHE chamados de pés astrocíticos (ALVAREZ; KATAYAMA; PRAT, 2013). A BHE é formada por células endoteliais que, devido sua alta proximidade, formam uma barreira física que protege o SNC de substâncias nocivas circulantes no sangue (SWEENEY et al., 2019).

A união das células endoteliais da BHE com os astrócitos, pericitos e neurônios forma a unidade neurovascular (UNV). Danos a BHE vêm sendo relacionados a doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson e a DA (HAWKINS; DAVIS, 2005; STANIMIROVIC; FRIEDMAN, 2012).

O controle da homeostase iônica realizado pelos astrócitos é alvo de estudos por estar relacionado ao sistema de tamponamento de íons de potássio (K⁺) (Figura 1). Este funciona da seguinte forma: após a despolarização neuronal causada pela sinapse, os íons K⁺ são direcionados para o espaço extracelular onde serão

recaptados pelos astrócitos e levados para os vasos da BHE ou regiões onde os níveis de K^+ não estejam elevados. A recaptção de K^+ ocorre, principalmente, pela bomba de sódio/potássio (ou Na^+/K^+ ATPase), transportadores NKC (de $Na^+/K^+/Cl^-$) e pelos canais de potássio K_{ir} do tipo 4.1, sendo esses específicos para células gliais (LICHTER-KONECKI et al., 2008; POSATI et al., 2016).

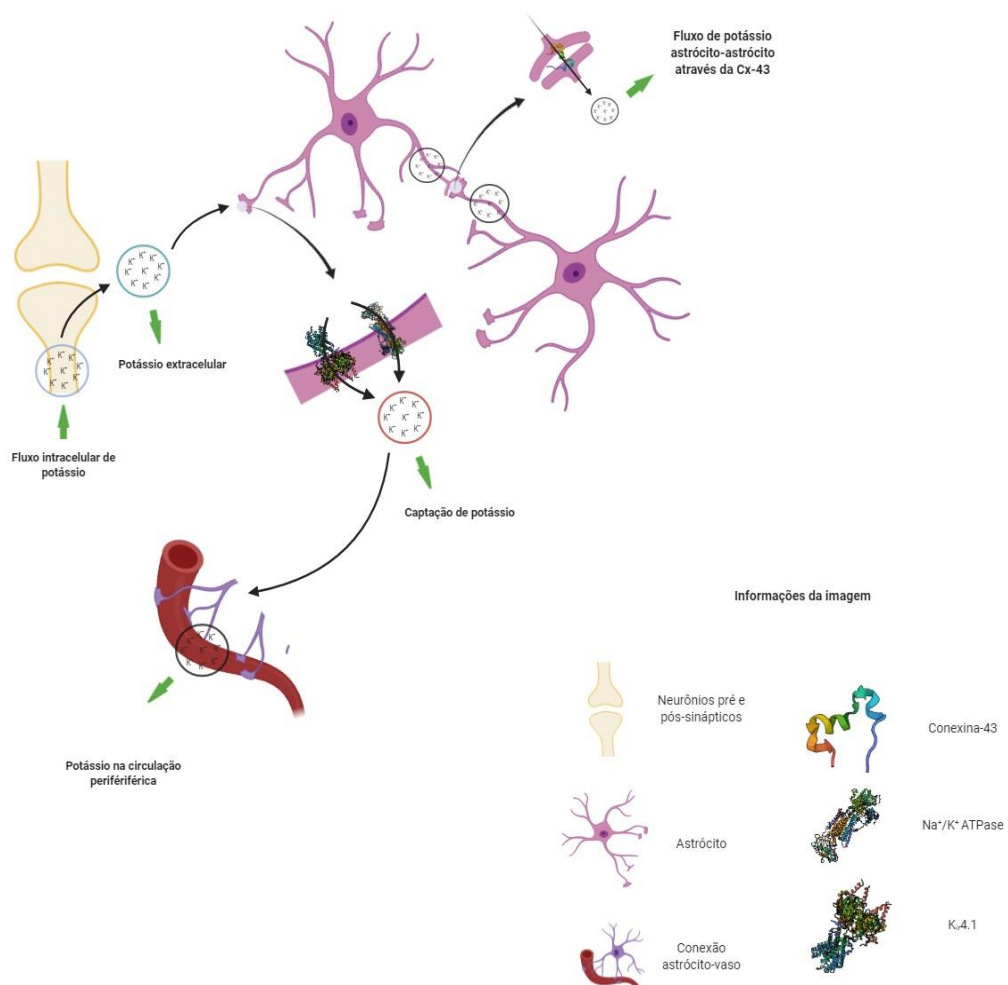


Figura 1: Demonstração do sistema de tamponamento espacial de potássio (K^+). O fluxo intracelular de K^+ devido a despolarização neuronal ocasiona a saída desse íon para o espaço extracelular onde é capturado pelos astrócitos através da Na^+/K^+ ATPase e $K_{ir}4.1$. Porém, a figura mostra também o sistema de redistribuição de K^+ através da junção astrócito-astrócito realizada pela $Cx-43$. O autor, 2020.

1.3.1 Canais de potássio

Uma regulação constante dos íons intra e extracelulares é fundamental para um bom funcionamento do SNC. Alterações na homeostase iônica do SNC estão vinculadas a diversos estados patológicos, causando mudanças nas concentrações de eletrólitos e no volume ocupado no espaço intersticial. Essas mudanças acarretam a desregulação da atividade da rede neuronal (BENFENATI; FERRONI, 2010).

A homeostase do K^+ é feita através de captação ativa, cotransporte e principalmente por canais retificadores internos de potássio (K_{ir} - do inglês – *inwardly rectifying K^+ channel*). Essa ação é de extrema importância para o controle da excitabilidade neuronal (HERTZ et al., 2015). Essa família de canais possui mais de 20 membros expressos entre $K_{ir}1.0$ até $K_{ir}7.0$, sendo o mais relacionado a homeostase do K^+ o $K_{ir}4.1$ (OLSEN; SONTHEIMER, 2008).

O $K_{ir}4.1$ é uma proteína de membrana que pode ser tanto homomérica ($K_{ir}4.1$) quanto heteromérica ($K_{ir}4.1/5.1$), essas estão distribuídas diferentemente em processos específicos no SNC. Nos astrócitos, é encontrada na região próxima aos dendritos neuronais e em domínios de membrana voltados para os vasos sanguíneos (HIBINO; KURACHI, 2007).

Associado ao $K_{ir}4.1$ encontra-se a aquaporina-4 (AQP4), isso porque as elevadas concentrações de K^+ no meio extracelular causam a saída de água da célula pelo efeito de osmolaridade (GUNNARSON; ZELENINA; APERIA, 2004). A AQP4 é uma das principais proteínas dos canais de água expressa pelos astrócitos e está distribuída no tecido de forma não homogênea, sendo encontrada principalmente em regiões como corpo caloso, córtex e hipocampo. Sendo uma proteína de canal, sabe-se que ela é responsável pelo balanceamento nas concentrações de água no SNC (GUNNARSON; ZELENINA; APERIA, 2004).

Associado ao sistema de tamponamento do K^+ encontra-se também a conexina-43 (Cx-43), a principal proteína formadora das junções comunicantes (do inglês *gap*) em astrócitos. Essas junções astrócito-astrócito fazem como que as células gliais funcionem como um sincício, regulando a distribuição de metabólitos e íons, transferindo K^+ por exemplo, de uma região hiperativa (com alta concentração extracelular desse íon) para uma região de menor atividade (ALMAD et al., 2016; GIEPMANS et al., 2001; KAWASAKI et al., 2009).

1.4 MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Do total de casos de DA, 95% são casos onde o tipo da doença é o esporádico, sendo assim, a maior parte dos modelos de DA tenta simular os efeitos do tipo mais comum. Nesse âmbito, estudos vem progredindo com uso de injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ – do inglês *streptozotocin*) (LANNERT; HOYER, 1998; MAYER; NITSCH; HOYER, 1990).

Estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureia)-1-D-glicopiranosose) é um componente do metabolismo secundário de bactérias do solo *Streptomyces achromogenes*. Devido a sua estrutura, a STZ é dada como um análogo citotóxico da glicose e é utilizada com agente alquilante na quimioterapia de pacientes com metástases pancreáticas e outros tipos de câncer (DOLAN, 1997; LENZEN, 2008).

Em mamíferos, o mecanismo de ação da STZ não é totalmente elucidado. Porém, sabe-se que a STZ é altamente tóxica para as células β -pancreáticas, sendo altamente específica para os transportadores de glicose do tipo II (GLUT2). A captação do STZ por esses transportadores culmina na alquilação do DNA, consequentemente levando a célula a um estado apoptótico. Além das células β -

pancreáticas, outros tecidos expressam GLUT2 (hepatócitos e células tubulares renais) e são suscetíveis a ação do STZ (BOLZÁN; BIANCHI, 2002; CO, 2013).

Sugere-se que, ao ser injetado no encéfalo através da via ICV, a STZ age sobre os receptores de glicose, diminuindo a captação dessa pelas células, prejudicando o metabolismo energético das mesmas (GRIEB, 2016). Porém, acredita-se também que a ICV-STZ promova uma cascata de reações para produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio levando assim a um estresse oxidativo da célula (BOLZÁN; BIANCHI, 2002).

O modelo de DA induzido por STZ consegue mimetizar a fisiopatologia da doença nos níveis comportamental, celular e molecular. Animais submetidos a um tratamento com STZ na dose de 3 mg/kg já apresentam, em variados períodos de tempo, dano cognitivo, deposição de β A e hiperfosforilação da proteína *tau* (BIASIBETTI et al., 2017; MEHLA; PAHUJA; GUPTA, 2013; NAZEM et al., 2015).

Nosso grupo tem caracterizado as alterações astrogliais em particular neste modelo, que podem estar associadas ao dano cognitivo ou a progressão da doença, tais como a reduzida captação de glicose que caracteriza o hipometabolismo da DA, a neuroinflamação mediada pela calcineurina ou a excitotoxicidade glutamatérgica. No entanto, não há estudos sobre as proteínas envolvidas no tamponamento espacial de potássio neste modelo – especificamente $K_{ir}4.1$, AQP4 e Cx-43. Tais alterações poderiam ser úteis para entender o dano causado neste modelo, bem como para entender o papel destas proteínas na gênese da DA, numa fase inicial prévia a cascata amiloide.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração intracerebroventricular de STZ (após 2, 4, 8 e 16 semanas) sobre mudanças cognitivas e o conteúdo de proteínas hipocampais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o dano cognitivo em tarefa dependente do hipocampo;
- Avaliar o conteúdo proteico de AQP4, Cx-43 e Kir4.1 no hipocampo
- Medir a concentração de albumina no líquido cefalorraquidiano (LCR) como avaliação indireta da permeabilidade da BHE.

PARTE II

CAPÍTULO I

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 90 dias pós-natal oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Este trabalho foi realizado após a avaliação e aprovação do mesmo pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS.

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

Os animais foram mantidos e criados de acordo com o padrão sanitário convencional no Biotério do Departamento de Bioquímica desta Universidade em condições ambientais e climáticas controladas com ciclos de luz claro/escuro a cada 12h (07h às 19h) e em temperatura controlada (21 a 24 °C) com acesso *ad libitum* a água e ração balanceada padrão (50% carboidrato, 22% proteína e 4% lipídeo) para roedores.

Como a altura das caixas para alojamento dos animais do biotério deste departamento não está em total acordo com a Resolução Normativa Nº15 de 16 de dezembro de 2016 do CONCEA, devido à ausência da verba necessária para compra destas caixas no momento, acomodamos um menor número de animais por caixa (3 animais/caixa de dimensões 410 x 340 x 160 mm; 1110 cm²; 145 mm altura) em cama de maravalha de *Pinus* selecionada e autoclavada.

3.2 INDUÇÃO DO MODELO

Os animais foram divididos em dois grupos: o ICV-STZ que recebeu uma injeção intracerebroventricular (ICV) bilateral de estreptozotocina (STZ - 3mg/kg), no volume total de 5 µL por ventrículo e o grupo *SHAM* que recebeu a ICV de solução salina (NaCl 0.9%) no mesmo volume também bilateralmente.

Anteriormente ao início do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados utilizando uma combinação de duas substâncias (cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg)). A aplicação do anestésico foi feita através de injeção intraperitoneal. Após anestesiados, os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico.

Logo após, foi realizada uma incisão na parte superior da cabeça do animal e os ventrículos foram acessados utilizando as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior a bregma; 1,5 mm lateral à sutura sagital; 3,6 mm abaixo da superfície do cérebro (BIASIBETTI et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

Após a cirurgia os animais foram colocados em almofadas de aquecimento para manter a temperatura corporal em 37 °C e mantidos nesse local até a recuperação da anestesia. Após este tempo, os mesmos foram colocados em suas caixas.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram divididos 8 grupos de diferentes tempos pós a indução do modelo de acordo com a tabela 1.

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Duração do tratamento (semanas)
SHAM e STZ	2
	4
	8
	16

Fonte: o autor, 2020. STZ = estreptozotocina

Transcorrido o tempo de cada grupo, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos e logo após o término deste, os animais foram anestesiados para posterior eutanásia e coleta de amostras (Figura 1).

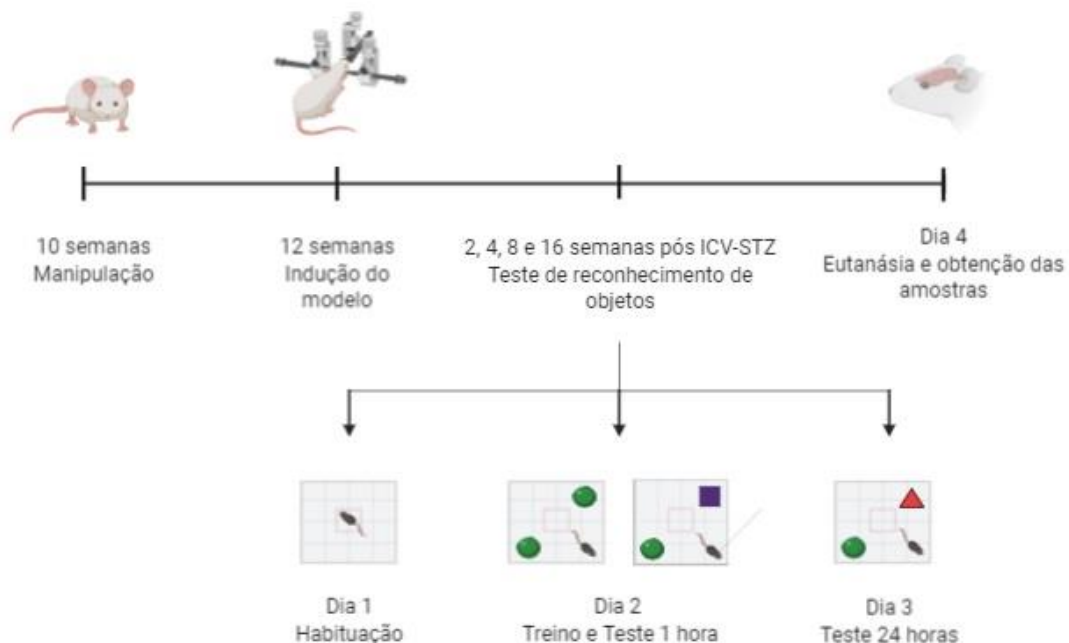


Figura 2: Desenho experimental. A figura mostra o cronograma de execução dos experimentos, incluindo o tempo de habituação e manuseio dos animais, procedimento cirúrgico para indução do modelo, teste de reconhecimento de objeto, esse último dividido em suas três etapas e por último a eutanásia e coleta de amostras. O autor, 2020.

3.4 TESTE COMPORTAMENTAL

Após o período de tratamento (2, 4, 8 e 16 semanas), foi realizado o teste de reconhecimento de objetos, onde foi avaliado o aprendizado e a memória do animal como descrito anteriormente por (BIASIBETTI et al., 2017).

O teste de reconhecimento de objeto é uma avaliação comportamental de memória dependente principalmente do comportamento exploratório inato de um roedor. Este teste é dividido em três etapas realizadas em 3 dias diferentes e consecutivos. Na primeira etapa do teste, a habituação, os ratos foram colocados no centro do aparelho para que fosse permitido explorar a área na ausência de objetos. No treinamento, realizado 24h após a primeira etapa, retornaram-se os ratos ao aparelho e este continha dois objetos idênticos em forma, tamanho e cor. A terceira etapa, o teste, foi realizada 1h e 24h após o treinamento, onde retornaram-se os ratos ao aparelho para testar a memória de curto (1h) e longo (24h) prazo. Nessa última fase do teste, o aparelho continha dois objetos: um objeto idêntico à sessão de treino e um outro objeto diferente (objeto novo). Cada sessão teve duração de 5 minutos e foi realizada em um aparelho de campo aberto com cada lado medindo 50 cm.

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

O tempo gasto pelos ratos em explorar os objetos foi monitorado por um sistema de vídeo (*Anymaze – Behavioural tracking software – versão 4.99*). A exploração de um objeto foi definida quando o animal cheirou ou tocou o objeto com o focinho (distância ≤ 2 cm) e/ou patas dianteiras. Para avaliar a performance cognitiva

do animal foi calculado o índice de reconhecimento (IR) de cada sessão. O cálculo realizado foi a razão do tempo de exploração do objeto novo (TON) sobre a soma do tempo de exploração do objeto antigo (TOA) e do TON. Segue a equação simplificada:

$$IR = \frac{TON}{(TOA + TON)}$$

Equação 1: Cálculo do índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento de objeto.

3.5 EUTANÁSIA, OBTENÇÃO DO LCR, HIPOCAMPO E SORO

Os procedimentos aqui descritos foram realizados seguindo todas as normas de ética na utilização de animais para experimentação. Para minimizar o estresse animal, os procedimentos foram realizados individualmente por operadores treinados em ambiente tranquilo na ausência de outros animais.

Para obtenção das amostras visando posterior processamento, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de cetamina (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Após, foram então posicionados em um aparelho estereotáxico e o LCR foi obtido através de uma punção na cisterna magna usando uma seringa de insulina (27 Gauge (G) x ½ polegada). As amostras de LCR foram congeladas a -80 °C até posterior análises.

Após a obtenção do LCR, através de um corte na região abdominal, foi feita uma punção intracardíaca utilizando agulha (21 G x 1 ¼ polegada) e seringa adequadas. O material coletado foi transferido para tubos de coleta com ativador de coágulo devidamente identificados e permaneceu em repouso por cerca de 30 minutos ou até a formação de coágulos. Seguinte, os tubos foram centrifugados (3200 rpm x 10 minutos), o soro coletado e aliquoteado e em seguida, as amostras obtidas foram submetidas ao congelamento em -80 °C.

Logo após a punção cardíaca, os animais foram eutanaziados por decapitação e os cérebros foram removidos e colocados em uma solução de tampão fosfato de sódio (PBS – do inglês *phosphate-buffered saline*) contendo: 51,33 mM de NaCl; 19,13 mM de NaH₂PO₄.H₂O; 81,01 mM de Na₂HPO₄; pH 7,4. O hipocampo foi dissecado e fatiado utilizando um equipamento de corte (McIlwain Tissue Chopper). Fatias de 300 µm foram obtidas, armazenadas em PBS, separadas em grupos de 1 e 4 fatias (conteúdo de GFAP e S100B; *immunoblotting*) em tubos *ependorf*[®] e posteriormente congeladas a -80 °C até o processamento das mesmas.

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de hipocampo obtidas foram submetidas ao procedimento de desnaturação proteica a fim de obter as proteínas em suas estruturas nativas. Para isso, foram adicionados às fatias 100 µL de tampão de amostra “A” (SDS 10%; EDTA a 100 mM; solução de hidroximetil-aminometano (TRIS) a 500 mM em pH 6,8; e água *Milli-Q*[®]) e em seguida, o sistema fatias + tampão de amostra “A” foi levado à fervura em um recipiente adequado contendo água ≈96 °C (±2 °C) por 8 minutos. Logo após, as amostras foram transferidas para novos tubos a fim de obter um volume final padrão.

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

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação do total de proteínas presente em cada amostra foi feito utilizando o método de Lowry (LOWRY et al., 1951). O método foi aplicado utilizando-se placas de 96 poços, onde foram aplicados 5 µL de cada amostra em triplicata. Foi adicionado em cada poço um volume de 100 µL do reagente de Lowry, onde a reação de incubação foi de 10 minutos em temperatura ambiente (TA). Seguido, foi adicionado em cada poço um total de 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu com incubação de 30 minutos em TA. Como padrão de proteína, foi feita uma curva de calibração a partir de quantidades crescentes de solução de albumina (1 mg/mL).

O cálculo do total de proteínas foi feito através do fator de calibração médio (FCM) obtido da curva de calibração. A concentração de proteínas foi expressa em µg/µL usando a seguinte equação;

$$CP = \frac{[(Abs - B) * FCM]}{V_{total}}$$

Equação 2: Equação para obtenção da concentração proteica. Abs = Absorvância; B = Branco; V_{total} = Volume total de amostra

O volume de amostra para realização da eletroforese foi determinado em relação a quantidade de proteína total. Os volumes aplicados em cada poço na eletroforese devem conter 20 µg de proteína.

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Com o preparo das amostras feito, as mesmas foram submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Os géis de entrada (acrilamida 40%; solução TRIS a 500 mM em pH 6,8; SDS 1%; água *Milli-Q*[®]; TEMED; persulfato de amônio 10%) e de separação (acrilamida 40%; solução TRIS a 1,5 M em pH 8,8; SDS 1%; glicerol 100%; água *Milli-Q*[®]; TEMED, persulfato de amônio 10%) foram preparados em concentrações de 10 e 4,5% de poliacrilamida, respectivamente.

A preparação dos géis foi feita em sistema de 8 x 8,5 cm (A x L) utilizando um pente para aplicação de 10 amostras. O tempo total de polimerização do gel final foi de 2h, sendo 30 min para o gel de separação e 1h30 min para o gel de entrada.

Com o gel pronto, o mesmo foi montado em uma cuba vertical embebido em tampão de eletroforese (TRIS a 25 mM; glicina a 190 mM; SDS 90% a 4,24 mM). As amostras foram aplicadas nos devidos poços e em seguida o sistema de corrida foi fechado e a fonte provedora de corrente foi iniciada com a seguinte programação: tensão de 180 V e corrente de ≈ 240 mA durante 1h.

3.9 TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE

Após a eletroforese, o sistema de corrida foi desmontado, o gel de entrada foi retirado e descartado, assim restando apenas o gel de separação com as proteínas de interesse. Esse último, foi mergulhado em solução de *Bjerrum* (TRIS a 48 mM; glicina a 38 mM; metanol a 20%) a fim de retirar o excesso de SDS.

O sistema de transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose foi montado utilizando um sistema *semi-dry* (Bio-Rad[®]) no formato de “sanduíche” (papel filtro; membrana de nitrocelulose; gel; papel filtro), os componentes desse foram previamente imersos em solução *Bjerrum*. Para a realização da transferência, uma tensão de 15 V e corrente de ≈ 192 mA foi aplicada ao longo de 1h.

3.10 IMUNODETECÇÃO

Transcorrido o tempo da transferência, as membranas foram retiradas do sistema *semi-dry* e alocadas em recipientes adequados (8,6 x 6 x 3 cm – C x L x A). Após, foram imersas em solução de bloqueio (albumina 2% em T-TBS (do inglês – *Tween-Tris Buffered Saline* – NaCl a 500 mM; TRIS a 30 mM; Tween 20 a 0,05%; água *Milli-Q*[®]; pH 7,5)) e ambientadas em câmara fria (4 °C) *overnight*.

Com o bloqueio realizado, as membranas foram lavadas com 15 mL de solução de T-TBS (3x; 5 mL por 5 min cada). Após as lavagens, as membranas foram submetidas a incubação com os anticorpos primários para as proteínas de interesse. No caso, foram utilizados *goat* anti-K_{ir}4.1 (1:5.000) (Santa Cruz Biotechnology), *rabbit* anti-AQP4 (1:5.000) (Santa Cruz Biotechnology) e *mouse* anti-Cx-43 (1:5.000) (Invitrogen). As diluições dos anticorpos foram feitas em solução de T-TBS. A incubação de cada anticorpo primário foi feita a 4 °C e *overnight*.

Findado o tempo de incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com 15 mL de solução de T-TBS (3x; 5 mL por 5 minutos cada). Após, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários HRP (do inglês – *Horseradish Peroxidase*): anti-*goat*, anti-*rabbit*, anti-*mouse*. A diluição destes foi feita sendo 1:10.000 em solução de T-TBS. A incubação com os anticorpos secundários foi feita a 4 °C durante 1h. Após esse período, as membranas foram lavadas com 15 mL de solução de T-TBS (3x; 5 mL por 10 minutos cada) e 5 mL de solução de TBS (do inglês – *Tris Buffered Saline* – NaCl a 500 mM; TRIS a 30 mM; água *Milli-Q*[®]; pH 7,5) (1x; 10 minutos).

A detecção das bandas foi feita utilizando uma solução comercial de ECL (do inglês – *Enhanced chemiluminescens*) (ThermoFisher) na proporção de 1:1 entre as soluções “A” e “B” (solução de uso).

Com a solução de uso preparada, foi vertido sobre cada membrana um volume de 400 µL dessa mesma solução, espalhado e aguardado o tempo de 1 minuto. As imagens de quimiolumescência foram obtidas através do *software ImageQuant® LAS 4000 CCD Camera System* (GE Healthcare) e a quantificação da intensidade dos pixels foi feita através do *software ImageJ (Image processing and analysis in Java – NIH)*.

3.11 DOSAGEM DE ALBUMINA NO LCR

Para dosagem de albumina no LCR, foi utilizado um método colorimétrico a partir da reação entre albumina e o verde de bromocresol. O ensaio foi performedo utilizando o kit comercial de albumina monoreagente (K040 – Bioclin) de acordo com as especificações da bula do kit.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi feita utilizando-se o *software GraphPad Prism* versão 6.0. Para a análise dos dados obtidos do comportamento e dos parâmetros bioquímicos foi realizado o teste t de *Student* não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO COGNITIVA

Na avaliação do desempenho cognitivo, observou-se uma perda significativa de memória de curto e longo prazo para todos os tempos analisados dentro do modelo (Figura 2A e B). Os dados são expressos pelo índice de reconhecimento do objeto novo pelo animal, sendo considerado que os animais do grupo STZ exploraram igualmente ($\leq 50\%$) os objetos para eles apresentados. Os animais do grupo Sham e os tratados realizaram uma maior exploração do objeto novo ($>50\%$).

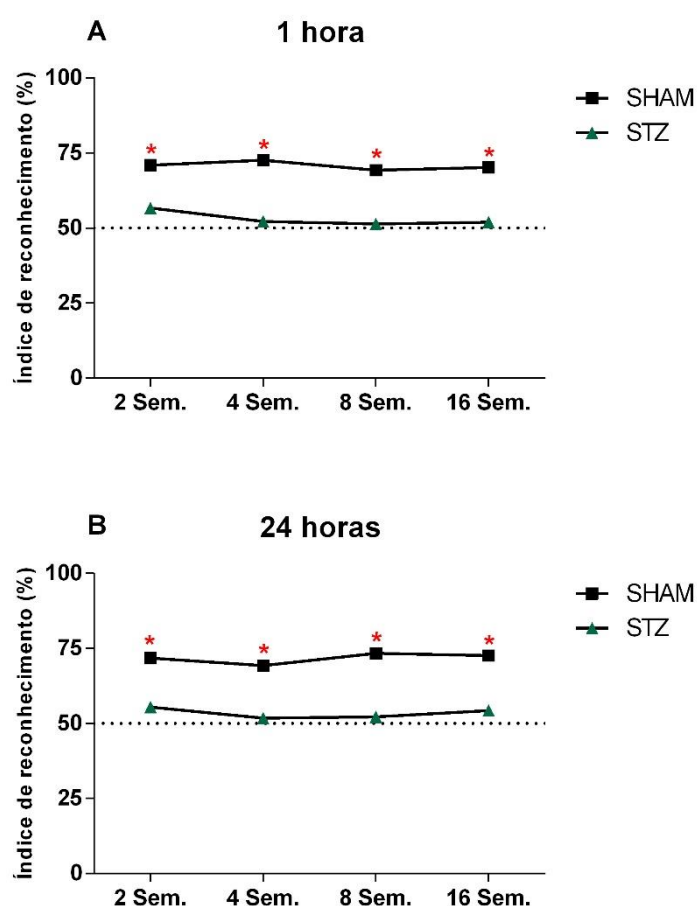


Figura 3: Desempenho cognitivo dos ratos adultos submetidos à injeção ICV de STZ (3 mg/kg). Os animais foram avaliados pelo teste de reconhecimento de objetos 2, 4, 8 e 16 semanas após o procedimento cirúrgico. A) Índice de reconhecimento dos animais por performance cognitiva 1 hora após o treino e B)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

4.2 IMUNOCONTEÚDO DE AQUAPORINA-4, CONEXINA-43 E Kir4.1

4.2.1 Aquaporina-4 (AQP4)

A avaliação do imunoconteúdo de AQP4 realizada neste trabalho mostrou que houve um aumento significativo do conteúdo desta proteína no hipocampo dos animais pertencentes ao grupo STZ de 4 semanas pós ICV-STZ. Por outro lado, para o tempo de 8 semanas, houve uma diminuição significativa do conteúdo da proteína também nos animais do grupo STZ (Figura 3A, B, C e D).

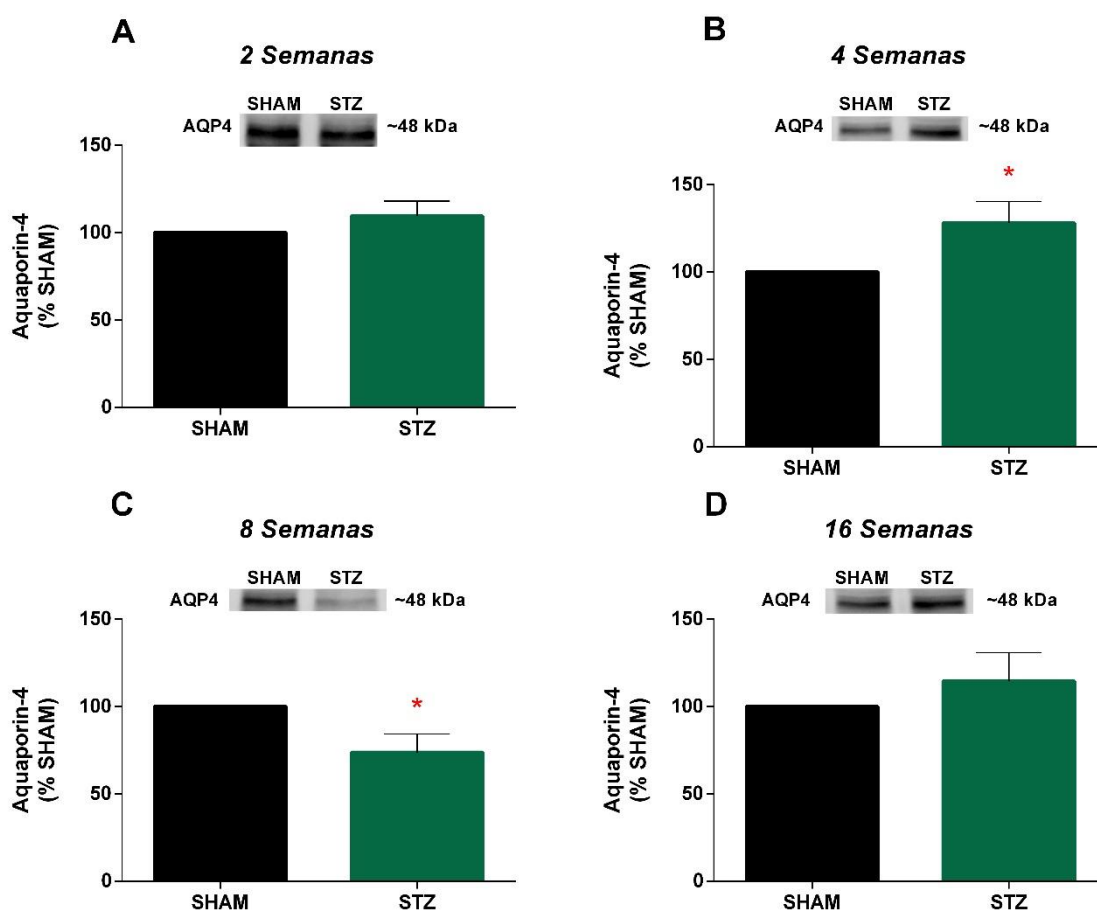


Figura 4: Imunocconteúdo de AQP4 em fatias de hipocampo em A) 2 semanas pós ICV-STZ B) 4 semanas C) 8 semanas D) 16 semanas determinado por *western blotting* e normalizado pelo total de proteínas aplicada em cada poço do gel durante eletroforese (20 μ g). Os dados estão expressos pela média \pm erro (N = 6 - 8 animais por grupo e por tempo), assumindo o grupo *SHAM* como 100%. Os dados foram analisados através de teste t de Student assumindo $p < 0,05$.

4.2.2 Conexina-43 (Cx-43)

A avaliação do imunocontéudo de conexina-43 realizada neste trabalho mostrou que houve uma diminuição significativa do conteúdo desta proteína no hipocampo dos animais pertencentes ao grupo STZ. Essa alteração foi vista nos tempos de 4, 8 e 16 semanas pós ICV-STZ. (Figura 4A, B, C e D).

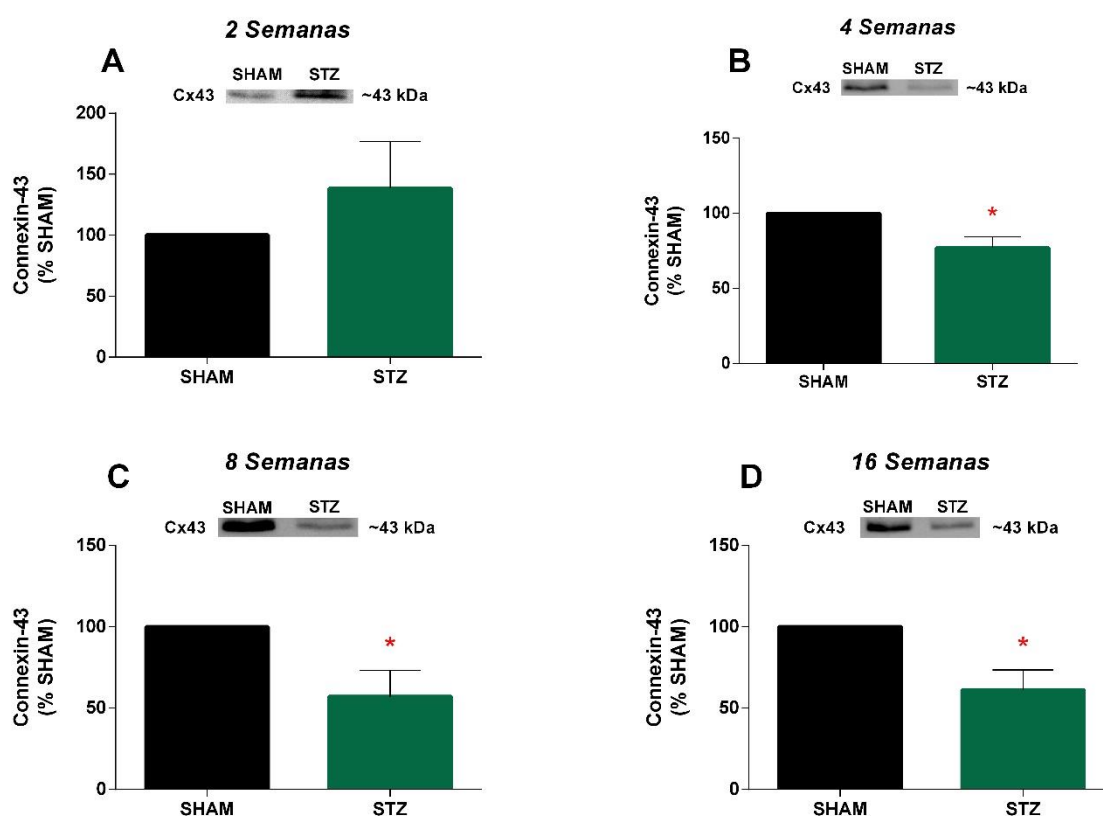


Figura 5: Imunocontéudo de Cx-43 em fatias de hipocampo em A) 2 semanas pós ICV-STZ B) 4 semanas C) 8 semanas D) 16 semanas determinado por *western blotting* e normalizado pelo total de proteínas aplicada em cada poço do gel durante eletroforese (20 μ g). Os dados estão expressos pela média \pm erro (N = 6 - 8 animais por grupo e por tempo), assumindo o grupo *SHAM* como 100%. Os dados foram analisados através de teste t de Student assumindo $p < 0,05$.

4.2.3 Kir4.1

A avaliação do imunocontéudo de Kir4.1 realizada neste trabalho mostrou que houve uma diminuição significativa do conteúdo desta proteína no hipocampo dos animais pertencentes ao grupo STZ. Essa alteração foi vista nos tempos de 8 e 16 semanas pós ICV-STZ. (Figura 5A, B, C e D).

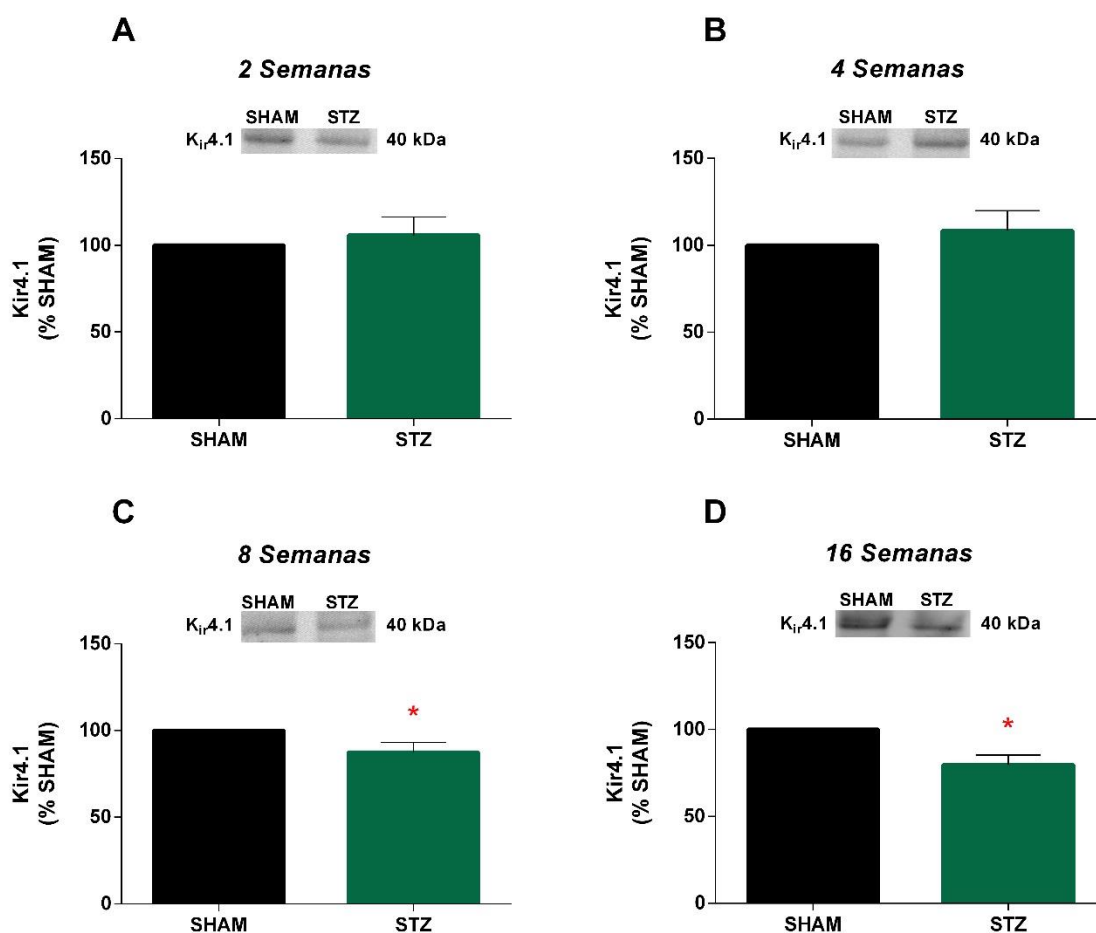


Figura 6: Imunocontéudo de Kir4.1 em fatias de hipocampo em A) 2 semanas pós ICV-STZ B) 4 semanas C) 8 semanas D) 16 semanas determinado por *western blotting* e normalizado pelo total de proteínas aplicada em cada poço do gel durante eletroforese (20 µg). Os dados estão expressos pela média ± erro (N = 8 - 10 animais por grupo e por tempo), assumindo o grupo SHAM como 100%. Os dados foram analisados através de teste t de Student assumindo $p < 0,05$.

4.3 DOSAGEM DE ALBUMINA NO LCR

A dosagem de albumina feita neste estudo não foi capaz de mostrar alterações significativas nas amostras de LCR dos animais ICV-STZ quando comparados ao grupo *SHAM* (Figura 6), sugerindo assim que, a BHE não está alterada no modelo.

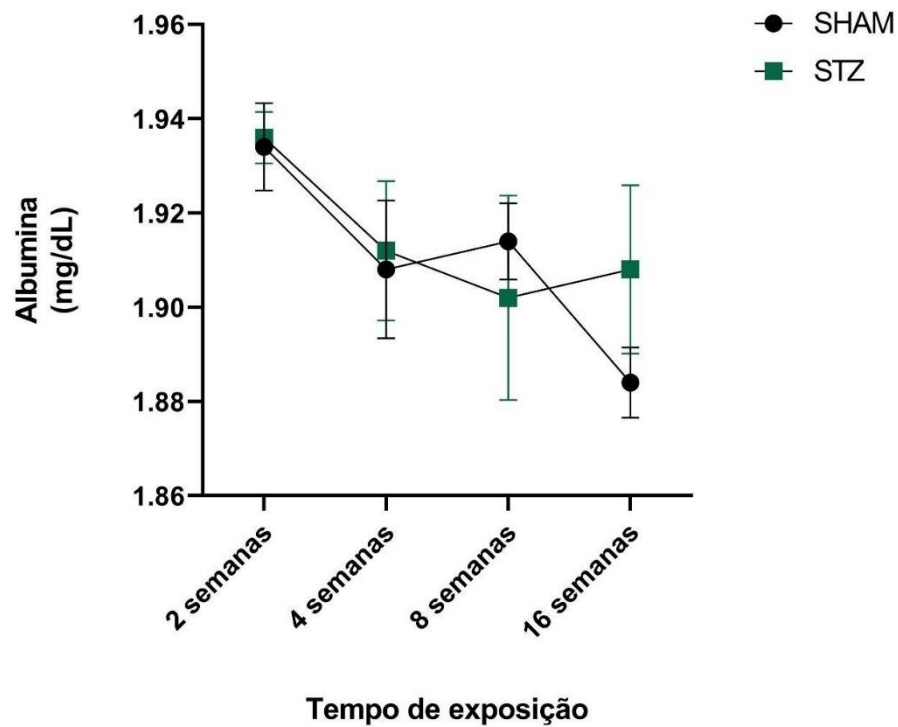


Figura 7: Concentração de albumina obtida pelo método colorimétrico de albumina do verde de bromocresol. Os dados estão expressos pela média (N = 5 animais por grupo e por tempo). Os dados foram analisados através de teste t de Student assumindo $p < 0,05$.

PARTE III

5 DISCUSSÃO

Com o passar do tempo, o número de pacientes acometidos pela DA vem crescendo de forma em que as pesquisas sobre as características celulares e moleculares, mecanismos fisio e anatomopatológicos da doença estejam sempre se renovando. Conhece-se há muito que, os portadores da DA carregam consigo alterações no SNC até hoje dadas como irreversíveis, nesse ponto cita-se a patologia da deposição de β A e a formação dos NFTs (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2019; BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019; MAYEUX; STERN, 2012; SERRANO-POZO et al., 2011).

Levando em consideração o que se tem relatado sobre a DA e sua fisiopatologia, está bem entendido que, o dano cognitivo na fase intermediária e final se deve ao peptídeo β A (BURNS, 2003; COSTA et al., 2019; DIANE E. HANDY RITA CASTRO JOSEPH LOSCALZO, 2011; LAMONICA, 2016). Porém, atualmente, vem-se tendo um crescimento na literatura sobre a DA que tenta desvendar o que está a “meio-tempo” entre os primeiros sinais e os estágios avançados da doença (entende-se aqui por “estágio avançado” o acúmulo de β A e a formação dos NFTs).

Tendo em vista o dano cognitivo apresentado na DA e a necessidade da investigação dos processos moleculares envolvidos no início da doença, com o passar do tempo tem-se dado uma atenção especial aos astrócitos e à micróglia, que junto com os oligodendrócitos são entendidos como células da glia. Essas possuem diversas funções desde atuarem como uma espécie de macrófagos do SNC (micróglia), formar a bainha de mielina para isolamento elétrico neuronal (oligodendrócitos) até realizar a nutrição dos neurônios, manter o controle sináptico e realizar a homeostase iônica e de neurotransmissores (astrócitos) (ARAQUE; NAVARRETE, 2010; JESSEN, 2004).

A importância da manutenção da homeostase iônica no SNC parece ser de grande importância para o bom funcionamento deste, já que os responsáveis por essa função possuem acoplados à sua membrana plasmática proteínas que permitem a passagem iônica do espaço extra para o intracelular ou vice-versa.

Dessas proteínas, pode-se citar a bomba Na^+/K^+ ATPase que faz a troca desses íons contra um gradiente de concentração as custas de uma molécula de ATP (adenosina trifosfato); os canais internos retificadores de K^+ (K_{ir}) que fazem a passagem seletiva de K^+ pela membrana sem a necessidade de gasto energético; os canais pertencentes à família das aquaporinas podem não ser canais iônicos propriamente ditos, porém nos astrócitos, a AQP4 está colocalizada com o canal $\text{K}_{\text{ir}}4.1$ e isso pode ser explicado devido ao fato de que, para manter as concentrações iônicas e covalentes tanto dentro quanto fora da célula, é necessário manter um controle preciso nas concentrações de água nesses meios, e esse é o papel da aquaporina-4 (GUNNARSON; ZELENINA; APERIA, 2004; HERTZ et al., 2015; SATOH et al., 2013).

A captação de K^+ pelas células gliais possui grande relevância de estudo, já que o excesso de K^+ extracelular pode levar a problemas na função das células neuronais, posto que os astrócitos além de internalizar grandes concentrações de K^+ e distribuir na circulação periférica, eles também mantêm uma concentração “reserva” para que, na falta deste íon nos neurônios o mesmo possa ser transportado para fora e recapturado por essa célula para que haja, normalmente, o potencial de ação e transmissão sináptica (DAVID WEINER; LINAS; WINGO, 2010; KOFUJI; CONNORS, 2003; WALZ; WUTTKE, 1999).

Para o estudo da patologia da DA, tem-se utilizado de forma ampla o modelo animal de demência induzido pela infusão ICV de STZ. Esse é um modelo não transgênico, que apresenta características encontradas em pacientes da DA, tais

como déficit cognitivo, deposição de β A, presença de NFTs, neuroinflamação, estresse oxidativo e hipometabolismo de glicose (BIASIBETTI et al., 2017; DOS SANTOS; VIZUETE; GONÇALVES, 2020; RODRIGUES et al., 2019; ZANOTTO et al., 2019).

Neste trabalho, utilizando o modelo não transgênico para estudo da DA induzido por ICV-STZ, foram avaliados fatores relacionados à memória e ao conteúdo de proteínas astrogliais associadas ao tamponamento do K^+ e que também estão, juntamente com outras proteínas, associadas a UNV. De acordo com dados anteriores do grupo (BIASIBETTI et al., 2017) demonstrou-se que os animais submetidos a esse modelo apresentam danos cognitivos quando avaliados em relação a memória dos roedores. O teste aplicado é baseado na tendência inata de um roedor em explorar o novo ao invés do já familiar.

Nos resultados aqui demonstrados, observamos que, em todos os tempos de tratamento após a ICV-STZ os animais apresentaram um déficit no IR na performance cognitiva em relação ao grupo *SHAM*. Esses dados corroboram com outros trabalhos no mesmo modelo (RAVELLI et al., 2017).

No sentido de avaliar uma relação de causa/consequência no âmbito de dano cognitivo no modelo ICV-STZ para a DA, neste trabalho foi avaliado o imunoc conteúdo de AQP4, Cx-43 e $K_{ir}4.1$, na tentativa de compreender melhor o papel do sistema de tamponamento espacial do K^+ na DA.

Nesse contexto, avaliamos o imunoc conteúdo do canal retificador interno de K^+ $K_{ir}4.1$. Foi observado que, nos tempos de 8 e 16 semanas houve uma diminuição significativa no conteúdo desta proteína em fatias de hipocampo. Efeito esse que pode levar ao acúmulo de K^+ extracelular, ocasionando assim uma perda no tamponamento desse íon, o que traz como consequência a desporalização dos neurônios

aumentando o número de disparos. Esse aumento no número de disparos neuronais eleva a concentração de K^+ extracelular, diminuindo a concentração desse íon no espaço intracelular neuronal, provocando a diminuição de sua repolarização (MARCHI; GRANATA; JANIGRO, 2014).

A ocorrência da diminuição de $K_{ir4.1}$ nesse modelo, pode estar relacionada com o processo inflamatório causado pelo STZ (GRIEB, 2016; MEHLA; PAHUJA; GUPTA, 2013), já que a sinalização excessiva de K^+ está associada a sinalização de uma das principais citocinas pró-inflamatórias, a interleucina-1 β (MARCHI; GRANATA; JANIGRO, 2014).

Estudos em um modelo de epilepsia mostram que o bloqueio seletivo de $K_{ir4.1}$ leva a uma diminuição da atividade neuronal (GRAUS; SAIZ; DALMAU, 2010), porém nesse caso, essa diminuição é temporária visando apenas o controle sintomático da patologia. Com esse achado, pode-se tentar relacionar a diminuição desse canal de K^+ mais a diminuição da atividade neuronal com o déficit cognitivo achado nos animais submetidos a ICV-STZ desse estudo.

Outro achado, mostra que em um modelo de camundongos *knockout* homocigotos para $K_{ir4.1}$ há uma relação de dependência entre $K_{ir4.1}$ e a mielinização axonal. Nesse estudo, os animais mostraram déficit motor, perda de movimento voluntário e tremores. O mesmo trabalho mostra que há também um aumento no número de células apoptóticas na medula espinhal do modelo em questão. A dependência de $K_{ir4.1}$ com a mielinização foi demonstrada através de cultura de oligodendrócitos dos animais *knockout* e analisada através de estudos de eletrofisiologia. Esses mostraram que, as células provenientes dos animais do grupo controle possuíam potencial de repouso de membrana de $-59,7 \pm 7,6$ mV, já os valores encontrados para as células dos animais *knockout* foi de $-34,3 \pm 2,9$ mV, mostrando

assim que a condutância elétrica nesse modelo está prejudicada. Os dados então mostram que em suma maioria, a forma de obtenção de K^+ dos oligodendrócitos é através do canal $K_{ir}4.1$, mostrando assim a relevância dessa proteína na mielinização (NEUSCH et al., 2001).

Neste trabalho também foi avaliado o imunoconteúdo de AQP4. Os resultados mostraram uma diminuição e um aumento significativos do conteúdo dessa proteína em fatias de hipocampo. Essas alterações foram vistas nos animais do grupo ICV-STZ nos tempos de 4 e 8 semanas, respectivamente. O aumento do conteúdo dessa proteína em 4 semanas pode estar relacionado com a tentativa de compensação na funcionalidade do canal $K_{ir}4.1$ e da proteína Cx-43 (BENFENATI; FERRONI, 2010).

Porém, não somente relacionada com a homeostase do K^+ , a AQP4 está envolvida no processo de passagem do βA solúvel (βA_s) do encéfalo para o LCR e sistema periférico (KRESS et al., 2014). Em um modelo de camundongos *knockout* para AQP4, o *clearance* do soluto intersticial contendo βA_s mostrou-se prejudicado (ILIFF et al., 2012), o que poderia corroborar com os achados neste trabalho para o tempo de 8 semanas, onde houve uma diminuição no conteúdo de AQP4, podendo assim, facilitar a patologia do βA_s , levando a um dano cognitivo em nosso modelo.

Para potencializar essa hipótese, estudos com camundongos transgênicos para DA e *knockout* para AQP4, mostraram que, nos animais com o gene da AQP4 deletado, a deposição de βA mostrou-se significativamente maior do que quando comparado aos controle não *knockout*, mostrando assim que a AQP4 pode estar relacionada com o *clearance* de βA em indivíduos portadores da DA (HOSHI et al., 2012; SMITH; DUAN; VERKMAN, 2019; WILCOCK; VITEK; COLTON, 2009; YANG et al., 2017).

Conhecendo-se a importância da Cx-43 na formação da unidade neurovascular, este trabalho investigou o imunoconteúdo dessa proteína no modelo ICV-STZ. Observou-se que, nos tempos de 4, 8 e 16 semanas houve uma redução significativa no conteúdo de Cx-43 nos animais do grupo ICV-STZ.

Dado o acoplamento entre o canal $K_{ir}4.1$ e a Cx-43, pode-se dizer que há uma relação direta dos resultados encontrados no conteúdo de ambas as proteínas nos tempos de 8 e 16 semanas no grupo ICV-STZ. A correlação entre as duas proteínas pode-se explicar tendo que uma das funções desse acoplamento seria de levar K^+ para espaços onde a concentração desse íon encontra-se baixa, já que a passagem deste pelo astrócito é facilitada pela presença da Cx-43, que faz a conexão célula-célula (BELLOT-SAEZ et al., 2017).

Estudos mostram que a diminuição dessas proteínas está associada a várias patologias do SNC, incluindo a DA (ZHENG; DAI; DAI, 2010). Nesse sentido, um estudo feito em ratos *knockout* para Cx-43 mostrou um aumento da morte neuronal ligado a diminuição dessa proteína em cultura de astrócitos desse modelo. Também, um estudo acerca da expressão do mRNA para Cx-43 em 6 regiões corticais (córtex pré-frontal, giro temporal inferior e médio, giro anterior cingulado, giro parahipocampal e córtex pré-frontal dorsolateral) demonstrou que essa está diretamente correlacionada com a patologia da DA (KAJIWARA et al., 2018).

Um estudo no modelo de diabetes induzido por STZ mostra que, uma diminuição do conteúdo desta proteína provoca uma redução na conexão célula-célula via Cx-43, o que leva também o modelo a uma perda da atividade vascular (ZHENG; DAI; DAI, 2010).

Neste trabalho, tentou-se também verificar a integridade da BHE no nosso modelo, tendo como objetivo avaliar a concentração de albumina no LCR. Porém,

variações encontradas entre os grupos *SHAM* e ICV-STZ não foram significativas para inferirmos que, neste modelo há ou não uma mudança na estrutura da BHE. Entretanto, trabalhos anteriores mostram que, em um modelo de diabetes *mellitus* induzida por IP-STZ há uma permeabilização da BHE, esse dado comprovado pela injeção IP do corante *Evans blue* (ZANOTTO et al., 2017).

Outros trabalhos mostram também, que em patologias do SNC ligadas a processos inflamatórios, a BHE sofre alteração em sua permeabilidade, facilitando assim a passagem de substâncias da periferia para o SNC, sendo que um dos primeiros achados que comprova essa hipótese é a presença de albumina em estudos com tecido animal em diversas neuropatologias (SWEENEY et al., 2018, 2019; SWEENEY; SAGARE; ZLOKOVIC, 2018).

Outro trabalho de nosso grupo de pesquisa avaliou o conteúdo das proteínas GFAP e S100B no mesmo modelo, porém utilizando os tempos de 2, 4 e 8 semanas após a ICV-STZ. No respectivo trabalho houve um aumento no conteúdo de S100B no tempo de 8 semanas, já o conteúdo de GFAP teve um aumento nos 3 tempos analisados, o que seria indicativo de reatividade astrocitária em função da neuroinflamação (BIASIBETTI et al., 2017).

Diante do exposto, os resultados do presente trabalho demonstram que, as proteínas astrogliais envolvidas no tamponamento espacial do K^+ e na unidade neurovascular estão alteradas e que essas alterações podem estar relacionadas com o dano cognitivo observado na DA.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante que se diga que um trabalho paralelo no laboratório mostra que o aumento do peptídeo beta amiloide não acontece até a oitava semana após a administração da STZ (BANDEIRA, 2020, dados não publicados). Com os resultados apresentados aqui, podemos inferir que o déficit cognitivo observado em um modelo da DA do tipo esporádica induzido por administração ICV-STZ esteja, possivelmente, relacionado ao dano inflamatório anterior à cascata amiloide. Para os tempos estudados, sugerimos que o dano cognitivo apresentado pelos animais esteja também relacionado com disfunções na comunicação astrócito-astrócito, já que na quarta semana após a ICV-STZ detectamos uma redução no conteúdo de Cx-43 e na capacidade tamponante espacial do K^+ , já que além da Cx-43 observamos redução no conteúdo de Kir4.1. Assim, os dados aqui apresentados contribuem para maior compreensão da fisiopatologia da DA e abrem perspectivas para novos estudos sobre o envolvimento das células gliais no modelo de ICV-STZ, particularmente no dano neuroinflamatório que precede a cascata amiloide observada na DA.

REFERÊNCIAS

- ALMAD, A. A. et al. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. **Glia**, v. 64, n. 7, p. 1154–1169, 2016.
- ALVAREZ, J. I.; KATAYAMA, T.; PRAT, A. Glial influence on the blood brain barrier. **Glia**, v. 61, n. 12, p. 1939–1958, 2013.
- ALZHEIMER ASSOCIATION. Alzheimer's Disease Facts and Figures Alzheimer's Dementia. **Alzheimer's and Dementia**, p. 1–88, 2019.
- AMARYA, S.; SINGH, K.; SABHARWAL, M. Ageing Process and Physiological Changes. **Gerontology**, p. 3–24, 2018.
- ARAQUE, A.; NAVARRETE, M. Glial cells in neuronal network function. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1551, p. 2375–2381, 2010.
- ASSEFA, B. T.; GEBRE, A. K.; ALTAYE, B. M. Reactive Astrocytes as Drug Target in Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, 2011.
- BATEMAN, R. J. et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 9, p. 795–804, 2012.
- BELLOT-SAEZ, A. et al. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 77, p. 87–97, 2017.
- BENFENATI, V.; FERRONI, S. Water transport between CNS compartments: Functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. **Neuroscience**, v. 168, n. 4, p. 926–940, 2010.

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

BLURTON-JONES, M.; LAFERLA, F. Pathways by Which A β ; Facilitates Tau Pathology. **Current Alzheimer Research**, v. 3, n. 5, p. 437–448, 2006.

BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, M. S. Genotoxicity of Streptozotocin. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 512, n. 2–3, p. 121–134, 2002.

BURNS, A. Treatment of cognitive impairment in Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 35–43, 2003.

BUTTERFIELD, D. A.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 148–160, 2019.

CALSOLARO, V.; EDISON, P. Alterations in Glucose Metabolism in Alzheimer's Disease. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 10, n. 1, p. 31–39, 2016.

CARREIRAS, M. et al. The Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease for Developing Potential Therapeutics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 15, p. 1745–1770, 2014.

CARTER, S. F. et al. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 2, p. 77–95, 2019.

CHAVES, M. L. et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 1–7, 2010.

CO, E. Ameliorative Potentials of Cocoyam (*Colocasia Esculenta* L.) and Unripe Plantain (*Musa Paradisiacal* L.) in Renal and Liver Growth in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **Journal of Diabetes & Metabolism**, v. 04, n. 05, 2013.

COSTA, A. C. et al. Plasma lipids metabolism in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 20, n. 3, p. 190–196, 2019.

DAVID WEINER, I.; LINAS, S. L.; WINGO, C. S. **Disorders of Potassium Metabolism**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010.

DE STROOPER, B.; WOODGETT, J. Mental plaque removal. **Nature**, v. 423, n. 6938, p. 392–393, 2003.

DIANE E. HANDY RITA CASTRO JOSEPH LOSCALZO. Understanding cognitive deficits in Alzheimer's disease based on neuroimaging findings. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.

DOLAN, M. E. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 26, n. 2–3, p. 105–118, 1997.

DOS SANTOS, J. P. A.; VIZUETE, A. F.; GONÇALVES, C. A. Calcineurin-Mediated Hippocampal Inflammatory Alterations in Streptozotocin-Induced Model of Dementia. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 502–512, 2020.

DUBOIS, B. et al. **Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria**. [s.l: s.n.]. v. 12

GIEPMANS, B. N. G. et al. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. **Current Biology**, v. 11, n. 17, p. 1364–1368, 2001.

GONG, C. X.; LIU, F.; IQBAL, K. Multifactorial Hypothesis and Multi-Targets for Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 64, n. s1, p. S107–S117, 2018.

GONZÁLEZ-REYES, R. E. et al. Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. December, p. 1–20, 2017.

GORDLEEVA, S. Y. et al. Bi-directional astrocytic regulation of neuronal activity within a network. **Frontiers in Computational Neuroscience**, v. 6, n. OCTOBER 2012, p. 1–11, 2012.

GRAUS, F.; SAIZ, A.; DALMAU, J. Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 4, p. 509–517, 2010.

GRIEB, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1741–1752, 2016.

GULOXSUZ, S. A. et al. Elevated plasma concentrations of S100 calcium-binding protein B and tumor necrosis factor alpha in children with autism spectrum disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 39, n. 3, p. 195–200, 2017.

GUNNARSON, E.; ZELENINA, M.; APERIA, A. Regulation of brain aquaporins. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 945–953, 2004.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 173–185, 2005.

HERTZ, L. et al. Role of the Astrocytic Na⁺, K⁺-ATPase in K⁺ Homeostasis in Brain: K⁺ Uptake, Signaling Pathways and Substrate Utilization. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 12, p. 2505–2516, 2015.

HIBINO, H.; KURACHI, Y. Distinct detergent-resistant membrane microdomains (lipid rafts) respectively harvest K⁺ and water transport systems in brain astroglia. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2539–2555, 2007.

HOSHI, A. et al. Characteristics of aquaporin expression surrounding senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 71, n. 8, p. 750–759, 2012.

ILIFF, J. J. et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 147, 2012.

IRAM, T.; FRENKEL, D. Targeting the Role of Astrocytes in the Progression of Alzheimers Disease. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 7, n. 1, p. 20–27, 2012.

ISRAEL, M. A. et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 216–220, 2012.

JÄKEL, S.; DIMOU, L. Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. February, p. 1–17, 2017.

JANY, P. L.; HAGEMANN, T. L.; MESSING, A. GFAP expression as an indicator of disease severity in mouse models of Alexander disease. **ASN Neuro**, v. 5, n. 2, p. 81–88, 2013.

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

KAJIWARA, Y. et al. GJA1 (connexin43) is a key regulator of Alzheimer's disease pathogenesis. **Acta neuropathologica communications**, v. 6, n. 1, p. 144, 2018.

KAWASAKI, A. et al. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 160, n. 1, p. 61–68, 2009.

KOFUJI, P.; CONNORS, N. C. Molecular Substrates of Potassium Spatial Buffering in Glial Cells. **Molecular Neurobiology**, v. 28, n. 2, p. 195–208, 2003.

KRESS, B. T. et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. **The Laryngoscope**, p. 2–31, 2014.

LAMONICA, H. M. Mild Cognitive Impairment , Dementia and Alzheimer ' s Disease. n. 2, p. 1–29, 2016.

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

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.

LICHTER-KONECKI, U. et al. Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. **Glia**, v. 56, n. 4, p. 365–377, 2008.

LISTA, S. et al. Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 47, n. 2, p. 291–317, 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MARCHI, N.; GRANATA, T.; JANIGRO, D. Inflammatory pathways of seizure disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 2, p. 55–65, 2014.

MAYER, G.; NITSCH, R.; HOYER, S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. **Brain Research**, v. 532, n. 1–2, p. 95–100, 1990.

MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, 2012.

MEHLA, J.; PAHUJA, M.; GUPTA, Y. K. Streptozotocin-Induced Sporadic Alzheimer ' s Disease : Selection of Appropriate Dose. v. 33, p. 17–21, 2013.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421–443, 2011.

NAVARATNARAJAH, A.; JACKSON, S. H. D. The physiology of ageing. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 1, p. 6–10, 2017.

NAZEM, A. et al. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2015.

NEUSCH, C. et al. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 15, p. 5429–5438, 2001.

OLSEN, M. L.; SONTHEIMER, H. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: From K⁺ buffering to cell differentiation. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 3, p. 589–601, 2008.

PALOP, J. J. AND M. L. Disease : From Synapses toward Neural Networks. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 812–818, 2011.

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

POSATI, T. et al. A nanoscale interface promoting molecular and functional differentiation of neural cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–16, 2016.

RAVELLI, K. G. et al. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 31, n. 3, p. 327–333, 2017.

RODRIGUES, L. et al. Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations. **Neurochemistry International**, v. 128, n. March, p. 85–93, 2019.

ROLAND, J. R.; JACOBSEN, H. Alzheimer's disease: From pathology to therapeutic approaches. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 17, p. 3030–3059, 2009.

SATOH, J. I. et al. Reactive astrocytes express the potassium channel Kir4.1 in active multiple sclerosis lesions. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, v. 4, n. 1, p. 19–28, 2013.

SERRANO-POZO, A. et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1–23, 2011.

SILVA, M. V. F. et al. Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 1–11, 2019.

SMITH, A. J.; DUAN, T.; VERKMAN, A. S. Aquaporin-4 reduces neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease by remodeling peri-plaque astrocyte structure. **Acta neuropathologica communications**, v. 7, n. 1, 2019.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in Neuroscience**, v. 32, n. 12, p. 638–647, 2010.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.

STANIMIROVIC, D. B.; FRIEDMAN, A. Pathophysiology of the neurovascular unit: Disease cause or consequence. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1207–1221, 2012.

SWEENEY, M. D. et al. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 1318–1331, 2018.

SWEENEY, M. D. et al. Blood-brain barrier: From physiology to disease and back. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 21–78, 2019.

SWEENEY, M. D.; SAGARE, A. P.; ZLOKOVIC, B. V. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer’s disease and other.pdf. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 3, p. 133–150, 2018.

TIWARI, S. et al. Alzheimer’s disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5541–5554, 2019.

VASILE, F.; DOSSI, E.; ROUACH, N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 5, p. 2017–2029, 2017.

WALZ, W.; WUTTKE, W. A. Independent mechanisms of potassium clearance by astrocytes in gliotic tissue. **Journal of Neuroscience Research**, v. 56, n. 6, p. 595–603, 1999.

WILCOCK, D. M.; VITEK, M. P.; COLTON, C. A. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer’s disease. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 1055–1069, 2009.

WILHELMSSON, U. et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 46, p. 17513–17518, 2006.

YANG, J. et al. AQP4 Association with Amyloid Deposition and Astrocyte Pathology in the Tg-ArcSwe Mouse Model of Alzheimer’s Disease. **Journal of Alzheimer’s Disease**, v. 57, n. 1, p. 157–169, 2017.

ZANOTTO, C. et al. Exendin-4 Reverses Biochemical and Functional Alterations in the Blood–Brain and Blood–CSF Barriers in Diabetic Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 3, p. 2154–2166, 2017.

ZANOTTO, C. et al. Glutamatergic Alterations in STZ-Induced Diabetic Rats Are Reversed by Exendin-4. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 5, p. 3538–3551, 2019.

ZHENG, Y.-F.; DAI, D.-Z.; DAI, Y. NaHS ameliorates diabetic vascular injury by correcting depressed connexin 43 and 40 in the vasculature in streptozotocin-injected rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 615–621, 2010.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	12
Figura 2:	20
Figura 3:	28
Figura 4:	29
Figura 5:	30
Figura 6:	31
Figura 7:	32

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1:	22
Equação 2:	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	20
-----------------	----