

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

JOÃO PAULO ALMEIDA DOS SANTOS

**O Modelo da Doença de Alzheimer Induzido por Estreptozotocina Altera a
Sinalização Hipocampal: Relevância da O-GlcNAcilação de Proteínas e a
Inflamação Mediada por Calcineurina**

PORTO ALEGRE

2017

JOÃO PAULO ALMEIDA DOS SANTOS

O Modelo da Doença de Alzheimer Induzido por Estreptozotocina Altera a Sinalização Hipocampal: Relevância da O-GlcNAcilação de Proteínas e a Inflamação Mediada por Calcineurina

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito para a obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Dr. Carlos Alberto Gonçalves

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, João Paulo Almeida
O Modelo da Doença de Alzheimer Induzido por
Estreptozotocina Altera a Sinalização Hipocampal:
Relevância da O-GlcNAcilação de Proteínas e a Inflamação
Mediada por Calcineurina / João Paulo Almeida dos
Santos. -- 2017.
123 f.
Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

Tese (Doutorado) -- 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, 2017.

1. Modelo da Doença de Alzheimer. 2. O-GlcNAcilação
de Proteínas. 3. Neuroinflamação. 4. Calcineurina. 5.
Glia. I. Gonçalves, Carlos Alberto Saraiva, orient.
II. Título.

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

Agradecimentos

Aos meus queridos pais, Antonio Alves dos Santos e Celina Almeida dos Santos, pelo carinho, sabedoria e pela insatisfação em aceitar o senso comum.

As minhas irmãs e minha querida sobrinha.

Ao meu companheiro de todos os momentos, Matheus Fochi.

Aos amigos da vida: José Roberto, Ricardo “Roche”, Cíntia, Raquel, Gabriela,

As amigas do laboratório: Nina, Adri, Lari, Krista, Cristiane, Paty Nardin, Tutti, Lets.

Ao Professor Carlos Alberto “CA”, por aceitar fazer parte de um sonho. Com sua cooperação e suporte consegui realizar meu sonho de ser Doutor em Bioquímica.

A todos que fizeram e fazem parte do Laboratório 33.

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

“O ato revolucionário é o ato livre por excelência”

Jean-Paul Sartre

Sumário

Parte I	08
Lista de Figuras	09
Lista de Abreviaturas	10
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	14
Revisão da Literatura	17
1. Doença de Alzheimer	18
1.1. Epidemiologia	18
1.2. Etiologia	19
1.3. Sinalização na Neurodegeneração da Doença de Alzheimer	23
2. Metabolismo da Glicose	26
3. Inflamação na Doença de Alzheimer	29
4. Modelo Animal da Doença de Alzheimer	33
Objetivos	36
Objetivo Geral	37
Objetivos Específicos	38

Parte II	39
Capítulo 1	40
Early and persistent O-GlcNAc protein modification in the streptozotocin model of Alzheimer's disease	41
Capítulo 2	54
Calcineurin-mediated hippocampal inflammatory alterations in streptozotocin model of Alzheimer's disease	55
Parte III	78
Discussão	79
1. Modificações Precoces e Persistentes da Proteína O-GlcNAc no Modelo de STZ ICV	80
2. Alterações Inflamatórias Mediadas pela Calcineurina no Modelo de STZ ICV	85
Conclusão	90
Referências	92
Anexos	120

Parte I

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema do Metabolismo da APP

Figura 2: Esquema de Fosforilação e Oligomerização da Proteína TAU

Lista de Abreviaturas e Siglas

APP - Proteína Precursora Amiloide

A β - β -amiloide

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHE - Barreira Hematoencefálica

COX - Ciclooxygenase

DA - Doença de Alzheimer

DSCR - Região Crítica da Síndrome de Down

DSM-5 - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

EAAT2 - Transportador de Aminoácidos Excitatórios 2

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FOXO - Fator de Transcrição *Forkhead Box*

GFAP - Proteína Glial Fibrilar Ácida

GFAT - Glutamina:Frutose-6-Fosfato Transaminase

GLT-1 - Transportador de Glutamato 1

GLUT - Transportador de Glicose

GS - Glutamina Sintetase

GSH - Glutathiona Reduzida

GSK3 β - Glicogênio Sintase Cinase 3

IBA-1 - Molécula Adaptadora Ligante de Cálcio Ionizado-1

ICV - Intracerebroventricular

IDE - Enzima de Degradação da Insulina

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada

IRK - Cinase Receptora de Insulina

IRS - Substratos do Receptor de Insulina

I κ B - Inibidor κ B

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

LPS - Lipopolissacarídeo

MAP - Proteína Associada aos Microtúbulos

MAPK - Proteína Cinase Ativada por Mitógeno

NFAT - Fator Nuclear de Células T Ativadas

NFT - Emaranhados Neurofibrilares

NMDA - Receptores N-Metil-D-Aspartato

NO - Oxido Nítrico

O-GlcNAc - O-glicosilação com N-Acetil Glusamina

OGT - Uridina Difosfo-N-Acetil Glusamina:Polipeptídeo β -N-Acetilglucosaminil transferase

PARP - Poli(ADP-Ribose) Polimerase

PI₃ - Fosfatidilinositol-3

PIP₂ - Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfato

PKA - Proteína Cinase A

PP - Proteínas Fosfatases

RCN 1-4 - Proteínas Reguladoras Endógenas da Calcineurina

RI - Receptor de Insulina

SGLT - Transportadores de Glicose Dependentes de Sódio

SNC - Sistema Nervoso Central

STZ - Estreptozotocina

TLR - Receptor Toll-Like

UDP-GlcNAc - Uridina Difosfo-N-Acetil Glusamina

VIVIT - Peptídeos Miméticos

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por um quadro clínico complexo e multifatorial, que envolve perdas cognitivas, déficit de memória e prejuízo na convivência social, observadas mais precocemente nessa população. O tecido cerebral dos portadores apresenta perdas neurais, disfunções neurovasculares, processos inflamatórios, gliose e lesões características da doença como as placas neuríticas e os emaranhados neurofibrilares. Ademais, as evidências apontam para similaridade entre DA e a demência induzida por *diabetes mellitus*, visto haver uma relação direta que liga a resistência e a deficiência na sinalização da insulina, com as mudanças no metabolismo da glicose. Essas alterações resultam em redução no estado de *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina das proteínas intracelulares, ativação das células gliais e o desequilíbrio homeostático na relação entre cinase/fosfatase desencadeada pela redução de metabólitos endógenos e aumento de cálcio intracelular. A resposta direta dessas mudanças é caracterizada pela expressão de marcadores celulares e liberação de mediadores inflamatórios que contribuem para a progressão e severidade da doença. Ainda, interações entre variações metabólicas e a ativação inflamatória alteram o microambiente do sistema nervoso central, ativando aguda e cronicamente astrócitos e microglia. Neste estudo investigamos a hipótese de que a infusão intracerebroventricular da estreptozotocina (STZ) desencadeia alterações patofisiológicas e moleculares em hipocampos. Em nossos experimentos, foram avaliadas as mudanças promovidas pela infusão de STZ após 1 e 4 semanas. Nossos resultados demonstram que a STZ afeta elementos importantes na via de sinalização da insulina no hipocampo, declínio das funções cognitivas e alterações neuroquímicas. Demonstramos que o grupo STZ apresentou níveis elevados da serina 307 do IRS-1 e redução na captação de glicose no hipocampo, possivelmente, através da resistência local à insulina e por disfunções astrocíticas. Além disso, demonstramos o impacto da ativação excessiva da calcineurina e a sinalização do fator nuclear de ativação das células T (NFAT), têm consequências a curto e longo prazo na progressão dos processos neurodegenerativos observados no modelo de DA esporádico.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a complex and multifactorial clinical presentation, which includes cognitive loss, memory deficits, and impairment in social coexistence, observed earlier in this population. The patients' brain tissue presents neural losses, neurovascular dysfunctions, inflammatory processes, gliosis, and characteristic lesions of the disease, such as senile plaques and neurofibrillary tangles. In addition, the evidence indicates to similarity shared AD and dementia induced by *diabetes mellitus* by occur a direct relationship of insulin resistance and deficiency in insulin signaling with changes in glucose metabolism. These changes result in lower levels of protein modified by glycosylation with *O*-linked β -*N*-acetyl-glucosamine of intracellular, in activation of glial cells, and homeostatic imbalance in the kinase/phosphatase relationship triggered by the decrease of endogenous metabolites and increase of intracellular calcium. The direct response of these changes is characterized by the expression of cellular markers and the release of inflammatory mediators that contribute to the progression and severity of the disease. Furthermore, interactions among metabolic variations and inflammatory activation alter the microenvironment of the central nervous system, activating acute and chronic astrocytes and microglia. We hypothesized that intracerebroventricular infusion of streptozotocin (STZ) triggers pathophysiological and molecular changes in hippocampus. The changes promoted by the STZ infusion were evaluated after one and four weeks. Our results show that insulin STZ affects important elements of the insulin-signaling pathway in the hippocampus, cognitive decline and neurochemical changes. Here, we show that STZ group had elevated levels of serine 307 phosphorylation of IRS-1 and decrease in the uptake of glucose into the hippocampus, possibly, through local resistance to insulin and by astrocytic dysfunction. In addition, these results indicate that aberrant calcineurin activation and nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling develop earlier and later consequences in the progression of the neurodegenerative processes observed in the sporadic AD model.

Introdução

Introdução

O envelhecimento é um processo biológico natural com alta complexidade e que envolve a redução progressiva de diversas funções bioquímicas e morfofisiológicas. O envelhecimento tem impacto significativo na saúde humana, visto aumentar a suscetibilidade a diversas doenças, incluindo câncer, distúrbios cardiovasculares, distúrbios metabólicos, como diabetes, e as doenças neurodegenerativas (PALE TYLER, 2016).

Como outros tecidos, o cérebro durante o envelhecimento apresenta alterações anatômicas e fisiológicas, conseqüentemente, há uma grande variabilidade no grau e extensão dos prejuízos nas regiões cerebrais afetadas, no início dos sintomas e as perdas de memória observada (SHIVARAMA SHETTY E SAJIKUMAR, 2017). Entretanto, as alterações cerebrais relacionadas a progressão da idade e a identidade dessas mudanças em relação ao envelhecimento continuam controversas (LIU *et al.*, 2017). Por sua vez, os déficits nas funções cognitivas, incluindo a memória, são as observações mais comuns durante o envelhecimento (SHIVARAMA SHETTY E SAJIKUMAR, 2017), e associado a outras perturbações cognitivas podem caracterizar um estado de demência.

A definição atual para demência, como classificado pelo DSM-5, é um transtorno neurocognitivo maior, caracterizada por declínio cognitivo significativo em um ou mais domínios cognitivos (atenção complexa, função executiva, aprendizagem e memória, linguagem, percepção motora ou cognição social) de forma evidente e suficiente para interferir no desempenho e independência do indivíduo nas suas atividades da vida diária (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Devido à grande heterogeneidade no funcionamento cognitivo de idosos com e sem demência (MUNGAS *et al.*, 2010), a separação entre o declínio cognitivo natural do envelhecimento normal e das diferentes etiologias de demência podem ser distorcidas (GALVIN *et al.*, 2005). Embora as doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (DA), demência com corpos de Lewy, demência frontotemporal e demência vascular sejam patologias distintas, o diagnóstico na maioria dos casos é feito apenas com sintomatologia clínica (JOHNS *et al.*, 2009).

A DA é a mais prevalente destas doenças neurodegenerativas, uma doença progressiva e irreversível clinicamente caracterizada por perda de memória e declínio cognitivo, que afeta gravemente as atividades da vida diária. A DA é a principal causa de demência em idosos, apresentando uma natureza progressiva de neurodegeneração, sugerindo um processo

dependente da idade, resultando em falha sináptica e dano neuronal em áreas corticais do cérebro essenciais para a memória e outros domínios cognitivos (VILLEMAGNE *et al.*, 2017). A maioria dos casos de DA são esporádicos e ocorrem na população idosa (> 60 anos de idade). Entretanto, aproximadamente 1-2% dos casos referem-se à forma precoce da doença a DA familiar (40-50 anos de idade) (HARDY E SELKOE, 2002).

Os mecanismos moleculares e fisiopatológicos da DA envolvem o desbalanço em diversas vias bioquímicas sinalizadoras, que são diretamente dependentes da relação fosforilação/desfosforilação de proteínas estruturais, fatores de transcrição e demais proteínas sinalizadoras no cérebro. Ademais, estudos clínicos tem evidenciado que pacientes com DA apresentam alterações proeminentes na regulação dos níveis glicêmicos, com características de hiperinsulinemia e resistência à insulina (OTT *et al.*, 1996; LEIBSON *et al.*, 1997) ou hipoinsulinemia (RONNEMAA *et al.*, 2008). Com os níveis cerebrais reduzidos de insulina e muitos outros substratos chave na via de sinalização *downstream* do receptor de insulina (RI) estão diminuídos em pacientes com DA (BOMFIM *et al.*, 2012; DE FELICE *et al.*, 2014).

Revisão da Literatura

1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer foi identificada pela primeira vez em 1906 por Alois Alzheimer, neurologista e psiquiatra alemão (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010). Baseado em observações realizadas na paciente de 51 anos chamada Auguste Deter. Em 1901, Alzheimer foi procurado pela família de Auguste após perceberem mudanças em sua personalidade e comportamento, com relatos de problemas na memória, além de dificuldades na falar e prejuízo na compreensão (KHACHATURIAN E RADEBAUGH, 1996). Com a morte de Auguste D em 1906, Alois Alzheimer realizou a autópsia e utilizou o cérebro como material para suas investigações.

Durante a autópsia, Alzheimer descobriu e descreveu uma dramática retração do córtex cerebral, depósitos de gordura nos vasos sanguíneos e células cerebrais atrofiadas (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010). Ainda, foram observadas alterações histológicas hoje conhecidas como placas senis e emaranhados neurofilamentares, que se tornaram os indicativos patológicos da DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010). Entretanto, somente em meados de 1960 a DA foi reconhecida como a causa mais comum de demência, após os estudos de Blessed (BLESSED *et al.*, 1968), que mostraram haver uma conexão entre as marcas características de placas senis e os emaranhados neurofilamentos com o declínio cognitivo, bem como uma das principais causas de morte.

1.1 Epidemiologia

A demência é uma condição neuropatológica progressiva que afeta mais de 26 milhões de pessoas mundialmente (CARDONA-GOMEZ E LOPERA, 2016), aproximadamente 7,1% da população com 65 anos de idade ou mais, sendo a DA responsável por 55,1% dos casos de demências diagnosticados (HERRERA *et al.*, 2002). A DA é a principal causa de declínio cognitivo, responsável por 35% a 80% dos casos de demência registrado em idosos (GRINBERG *et al.*, 2013). Destes, cerca de 50% dos casos apresentam apenas neuropatologias associadas a DA, e nos outros caso pode ocorrer concomitância com outras neuropatologias, criando uma condição de demência mista (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010).

Como a prevalência da DA é diretamente proporcional ao envelhecimento da população, seu crescimento ocorre de forma exponencial com o aumento da idade. A prevalência da DA tende a dobrar aproximadamente a cada cinco anos depois dos 65 anos.

Embora a prevalência seja por volta de 2% naqueles com idade entre 65 a 69 anos, seu avanço vem progredindo até atingir os valores entre 35 a 40% da população acima de 85 anos (KAWAS, 2000).

Estima-se que cerca de 5,4 milhões dos americanos de todas as idades irão desenvolver a DA. Nestes valores incluem 5,2 milhões de pessoas com idade igual ou superior a 65 anos, além de aproximadamente 200.000 indivíduos com idade inferior de 65 anos que desenvolverão a DA familiar ou precoce. Estes números representam uma população composta por 11% das pessoas com 65 anos que possui a DA, quando avaliadas a faixa etária composta por pessoas com 85 anos ou mais os valores chegam a 32% dessa população. Entretanto, a maior incidência da DA continua sendo na população acima de 75 anos de idade, representando 81% dos pacientes diagnosticados (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010).

Embora os dados epidemiológicos da DA sejam reduzidos no Brasil, estima-se que a prevalência chega próximo de 1,2 milhões de pacientes, com uma incidência que pode atingir 100 mil novos casos por ano (GARRIDO E MENEZES, 2004). Esses índices atingem 1,3% da população idosa acima de 65 anos e ultrapassam o valor de 38% quando esta população atinge 85 anos de idade (HERRERA *et al.*, 2002). Atualmente, cerca de 54% dos idosos com diagnósticos de demências tem DA, segundo os dados do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), e as estimativas em 2010, eram de 1 milhão de idosos no Brasil com diagnóstico de Alzheimer, com expectativa que em 2020 serão 1,6 milhão (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER, 2016).

1.2 Etiologia

As principais características neuropatológicas nos cérebros de pacientes com DA parecem ser placas senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares (NFT) intracelulares (GLENNER E WONG, 1984; GRUNDKE-IQBAL *et al.*, 1986). A patogênese da DA tem seu início de degeneração nas áreas límbicas do lobo temporal, envolvidas na cognição e memória de curta duração, mais precisamente no hipocampo e no córtex entorrinal (BRAAK *et al.*, 1999). As perdas neuronais progressivas ocorrem principalmente nas camadas piramidais, afetando primariamente as estruturas límbicas e os córtices associativos, contudo preservando relativamente as áreas corticais primárias (HOFFMAN *et al.*, 2000).

O desenvolvimento das placas senis começa primeiramente nas áreas cerebrais associadas à cognição, aumentando sua distribuição para áreas outras áreas corticais com progressão da doença. As placas senis consistem, entre outros componentes, de depósitos insolúveis do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), um fragmento com capacidade de agregação da proteína precursora amiloide (APP) (SCHACHTER E DAVIS, 2000). Por sua vez, o acúmulo de NFT nos neurônios é uma segunda característica distintiva da DA. Os NFT são formados por dobramentos e fosforilações anormais da proteína TAU, uma proteína envolvida na formação e estabilização de microtúbulos (SCHACHTER E DAVIS, 2000).

A clivagem não-amiloidogênica ou a amiloidogênica da APP é iniciada pela ação de enzimas proteolíticas α - e β -secretase (HAASS E SELKOE, 2007; QUERFURTH E LAFERLA, 2010), respectivamente. A APP pode produzir $sAPP\alpha$ via a proteólise realizada pela ação da α -secretase, produzindo formas clivadas solúveis, visto não ocorrer a produção do peptídeo $A\beta$, e possíveis de serem depuradas do sistema nervoso central (SNC) (LAMMICH *et al.*, 1999). Na via amiloidogênica, o peptídeo $A\beta$ é gerado a partir da APP por dois eventos de clivagem consecutivos: a atividade proteolítica realizada pela β -secretase, que gera uma extremidade do peptídeo $A\beta$, enquanto o complexo enzimático γ -secretase, o qual é constituído pelas proteínas presenilinas 1 e 2 e outras proteínas, gera outra extremidade. O complexo γ -secretase pode agir em três diferentes sítios de clivagem, gerando os peptídeos $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$ (GU *et al.*, 2001), os quais são críticos para o processo de agregação do peptídeo $A\beta$, com o peptídeo $A\beta_{1-42}$ apresentando o maior grau de propensão a agregação (SUZUKI *et al.*, 1994), como demonstrado na figura 1.

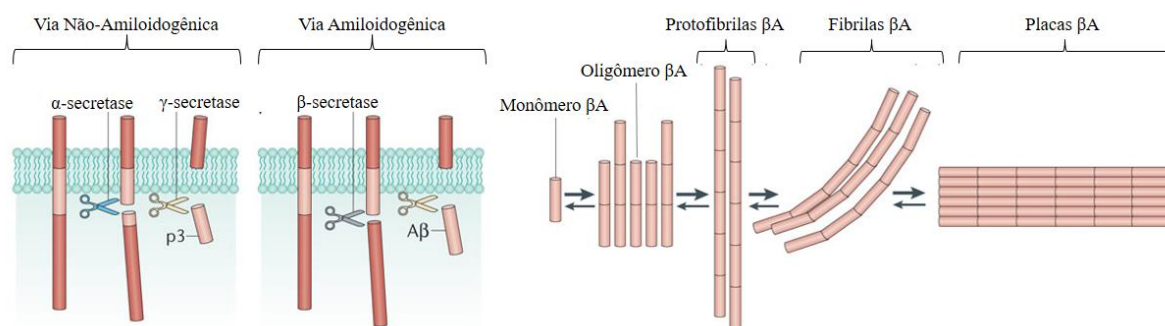


Figura 1: Esquema do Metabolismo da APP - A clivagem da APP ocorre pela via não amiloidogênica ("fisiológica") ou amiloidogênica ("patológica"). O local de clivagem utilizado pela γ -secretase na via amiloidogênica determina a formação predominante do peptídeo $A\beta_{40}$ ou o $A\beta_{42}$ com maior poder de agregação e neurotoxicidade. Fonte: (HEPPNER *et al.*, 2015)

A TAU é uma proteína associada aos microtúbulos (MAP) neuronal, sendo conhecida pela ligação e estabilização dos microtúbulos, podendo realizar *cross-linking* com outros elementos do citoesqueleto ou fornecendo locais de acoplamento enzimático (TRINCZEK *et al.*, 1995). A fosforilação da TAU ocorre fisiologicamente na metáfase, durante a divisão e a diferenciação neuronal, promovendo a plasticidade sináptica (GOEDERT *et al.*, 1993; LIU, T. *et al.*, 2004). Entretanto, a fosforilação anormal da TAU afeta negativamente as habilidades de ligação a tubulina, perturbando a estrutura do microtúbulo. A TAU possui 85 sítios possíveis de fosforilação e mais de 20 serina/treonina cinases responsáveis pela fosforilação. Esses diferentes sítios de fosforilação são associados com disfunções da TAU e a neurodegenerações (SERGEANT *et al.*, 2008; HANGER *et al.*, 2009). A fosforilação anormal da TAU no cérebro de pacientes com a DA, altera a conformação da proteína, reduzindo sua afinidade pelos microtúbulos, resultando em instabilidade do microtúbulo e favorecendo a formação de emaranhados neurofibrilares (EIDENMULLER *et al.*, 2000; TROJANOWSKI *et al.*, 2002).

O grau e a extensão da fosforilação da TAU são regulados pelos efeitos equilibrados das proteínas cinases e das proteínas fosfatases (PP). Entre várias proteínas cinases envolvidas na fosforilação, a proteína cinase A (PKA) e glicogênio sintase cinase 3 (GSK3 β), são as mais importantes cinases no que diz respeito à fosforilação TAU (HOSHI *et al.*, 1996; TIAN *et al.*, 2009; MARTIN *et al.*, 2013). Achados experimentais têm correlacionado o aumento da atividade da GSK3 β na fosforilação da proteína TAU com o aumento da agregação, associado a isso, a disfunção na sinalização da insulina tem impacto direto no aumento da atividade da

GSK3 β e da fosforilação da TAU, eventos críticos na patogênese da DA (PEREZ *et al.*, 2003; NOBLE *et al.*, 2005; TOKUTAKE *et al.*, 2012). Ainda, verificou-se que a expressão de proteínas de fosfatases (PP) PP1, PP2A e PP5 estão reduzidas nos tecidos cerebrais de pacientes com DA (DELACOURTE E BUEE, 2000; WANG *et al.*, 2007).

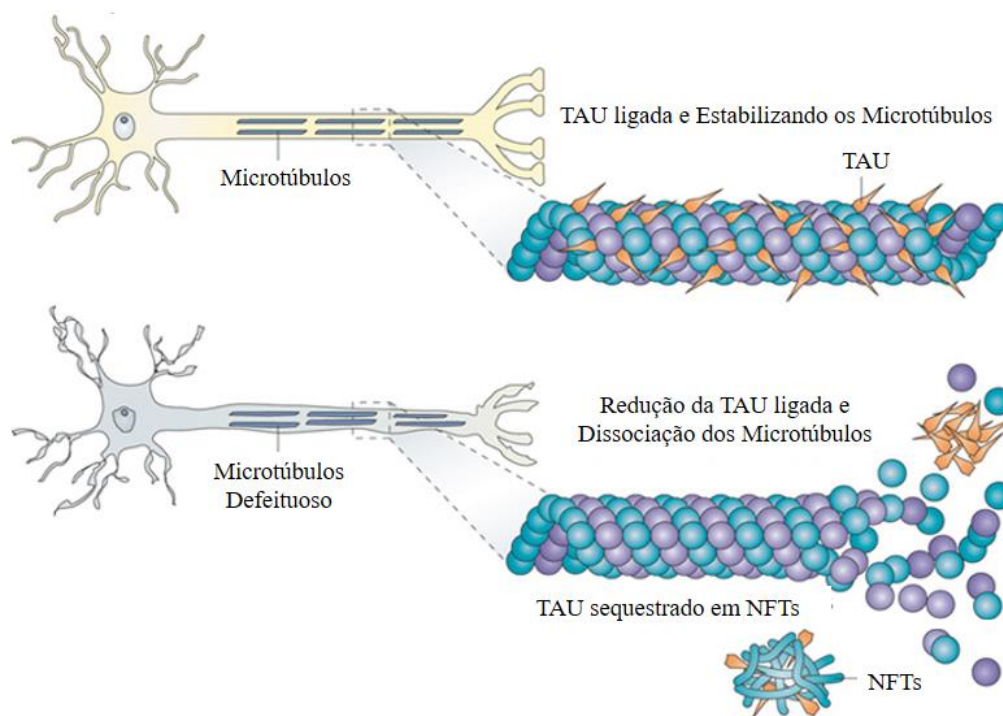


Figura 2: Esquema de Fosforilação e Oligomerização da Proteína TAU - A proteína Tau participa da estabilização dos microtúbulos nos neurônios. Na doença de Alzheimer a hiperfosforilação da TAU reduz a ligação da proteína aos microtúbulos e ao ser hiperfosforilada é sequestrada em emaranhados neurofibrilares (NFTs). Fonte: (BRUNDEN *et al.*, 2009)

As consequências diretas da ação reduzida da insulina em órgãos periféricos são utilizadas para explicar as anormalidades funcionais e estruturais associadas à resistência à insulina, como aquelas observadas no diabetes tipo 2, prolongando o estresse metabólico e a sinalização inflamatória (GREGOR E HOTAMISLIGIL, 2011). Curiosamente, os cérebros de pacientes com a DA apresentam alterações semelhantes (DE FELICE *et al.*, 2014). Assim, torna-se possível uma similitude de mecanismos entre a resistência periférica à insulina, característica do diabetes tipo 2, e a alteração na sinalização da insulina no cérebro dos pacientes na DA. Visto que os efeitos da insulina encontram-se difundidos no cérebro, já que os receptores de insulina (RI) estão amplamente distribuídos por todo o encéfalo. No

hipocampo os níveis dos RI apresentam-se elevados, indicando que a insulina pode ter alvos adicionais no SNC fora do hipotálamo (DE FELICE, 2013). A ativação dos RI resulta na fosforilação dos membros de uma família de proteínas chamadas substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), que parecem estarem envolvidos com os efeitos positivos da insulina na memória e aprendizado de animais diabéticos, em particular o IRS-1 que se mostra importante na função adequada do cérebro e é encontrado inibido nos cérebros de pacientes com DA, como em modelos animais da doença. Conseqüentemente, a redução na inibição do IRS-1 tem mostrado clara melhora na cognição de modelos transgênicos da DA (DE FELICE, 2013).

1.3. Sinalização na Neurodegeneração da DA

As evidências apontam para diversas direções quando avaliamos a fisiopatologia da DA. Uma das hipóteses acredita na deficiência de enzimas envolvidas no funcionamento do ciclo do ácido tricarboxílico, além da redução das funções mitocondriais e estabilidade do DNA mitocondrial. Uma hipótese muito investigada durante muitos anos é a influência do peptídeo amiloide no início e progressão da DA, além dos seus efeitos sobre o funcionamento do tecido cerebral. Entretanto, outros fatores têm mostrado envolvimento nas possíveis causas da DA, como estresse oxidativo, hiperfosforilação da proteína tau, proteína príon e fatores ambientais (SWERDLOW *et al.*, 2010). Um ponto importante observado em pacientes com diabetes tipo 2 e DA são as deficiências na utilização da glicose pelo tecido cerebral, o metabolismo energético e a inflamação, representando anomalias precoces e que precedem ou acompanham os estágios iniciais de deterioração cognitiva, seja por expressão reduzida de RI, redução da atividade tirosina cinase do RI ou ativação do IRS-1 e/ou fosfatidilinositol-3 (PI3) cinase (VIRKAMAKI *et al.*, 1999).

A insulina medeia os seus efeitos metabólicos tanto em órgãos periféricos como no SNC pela ativação de vias de sinalização intracelular complexas. A sua ligação aos receptores de superfície inicia a autofosforilação e ativação intrínsecas das tirosinas cinases receptoras (ULLRICH *et al.*, 1985; O'HARE E PILCH, 1990; MYERS *et al.*, 1994). A cinase receptora de insulina (IRK) fosforila moléculas de IRS, que transmite sinais *downstream* e ativam as proteínas cinases ativada por mitógeno (MAPK) e as vias PI3 cinase/Akt, inibindo a glicogênio sintase cinase 3 β (GSK3 β) (WHITE *et al.*, 1985; SUN *et al.*, 1991; SUN *et al.*, 1993; MYERS *et al.*, 1994). Como resultado da ativação dessa via, através do IRS, observamos o

aumento no crescimento celular, metabolismo energético e expressão colinérgica, além da inibição do estresse oxidativo e apoptose (PURO E AGARDH, 1984; MILL *et al.*, 1985; SUN *et al.*, 1993; LAM *et al.*, 1994; BURGERING E COFFER, 1995; DUDEK *et al.*, 1997; KULIK *et al.*, 1997; DELCOMMENNE *et al.*, 1998). Conseqüentemente, disfunções nessa via pode resultar em efeitos tóxicos pelos altos níveis de glicose por meio das vias do poli-ol e hexosamina, com produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e pela glicação avançada de proteínas (BROWNLEE, 2001). Ainda, a insulina afeta o metabolismo de A β e TAU, ambas envolvidas no desenvolvimento das placas senis e emaranhados neurofibrilares, características neuropatológicas presentes na doença de Alzheimer (BIESSELS *et al.*, 2005).

Os mecanismos neuropatogênicos envolvidos tanto na resistência à insulina periférica do diabetes tipo 2, como na sinalização da insulina no cérebro de pacientes com DA, tem mostrado semelhanças no processo de formação do peptídeo A β (DE FELICE *et al.*, 2014). O peptídeo A β é derivado da APP, que após sua secreção no espaço extracelular pode agregar-se com outras proteínas para formação das placas senis. Em condições fisiológicas, o peptídeo A β excessivo pode ser eliminado através da endocitose mediada por proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) ou através da degradação proteolítica extracelular direta (LING *et al.*, 2003), envolvendo a enzima de degradação da insulina (IDE) (FARRIS *et al.*, 2003). A insulina afeta a secreção de A β e inibe a degradação extracelular de A β pela competição de IDE (GASPARINI E XU, 2003). Assim, a insulina poderia elevar o nível de peptídeo A β extracelular, modulando a atividade da γ -secretase ou aumentando sua liberação pelos neurônios, além de reduzir os níveis e a atividade da IDE no cérebro em condições de hiperinsulinemia (TAKEDA *et al.*, 2011). Curiosamente, a alteração na sinalização da insulina acelera a produção de A β no cérebro, aumentando o processamento amiloidogênico da APP, que resulta no aumento da fibrilogênese a partir de oligômeros de A β . Assim, a resistência à insulina induzida por oligômeros pode gerar um ciclo vicioso entre o aumento na produção e na agregação, interrompendo as ações fisiológicas da insulina e podendo explicar em parte o acúmulo de A β em cérebros de DA (DE FELICE *et al.*, 2014).

O aumento na fosforilação da proteína TAU tem sido apontado como fator presente nos cérebros de animais submetidos a modelos de diabetes e que apresentam hiperinsulinemia periférica semelhante ao diabetes tipo 2 (FREUDE *et al.*, 2005). A hiperfosforilação da proteína TAU no tecido cerebral vem sendo observada e comprovada na etiopatogênese da DA (ALONSO *et al.*, 2008; GONG E IQBAL, 2008), principalmente pelo papel da insulina na

regulação da atividade enzimática de algumas cinases responsáveis pela fosforilação da TAU (JIANG *et al.*, 2003). Assim, tanto a sinalização anormal da insulina quanto as flutuações patológicas da glicose podem contribuir para a hiperfosforilação da TAU, particularmente nos pacientes com diabetes, ou até mesmo anteceder o comprometimento cognitivo na DA. As evidências apontam que na DA as vias de sinalização da insulina estão prejudicadas, reduzindo a expressão dos RIs e da IDE, e com o aumento da atividade da GSK3 (FROLICH *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2000; COOK *et al.*, 2003; STEEN *et al.*, 2005). Embora a fosforilação da GSK3 β provoque a ativação da glicogênio sintase e aumente os níveis de glicogênio em órgão periféricos sensíveis à insulina, vem sendo demonstrado que GSK3 β regula a fosforilação da TAU. Logo, a ativação da GSK3 β em pacientes com DA poderia induzir a hiperfosforilação da proteína TAU, o que contribuiria com a formação de emaranhados neurofibrilares.

2. Metabolismo da Glicose

O cérebro em conjunto com os principais órgãos periféricos, o coração, o fígado e os rins, é responsável pelo consumo de aproximadamente 60% da energia ingerida pelo corpo em repouso (CUNNANE *et al.*, 2011). Tanto estudos *in vitro* como *in vivo* têm mostrado que a maior parte da glicose consumida pelo cérebro é utilizada para manutenção dos gradientes iônicos pré- e pós-sinápticos, responsáveis pelas neurotransmissões excitatórias e para manutenção do potencial de repouso dos neurônios (ATTWELL E IADECOLA, 2002; SHULMAN *et al.*, 2004). Toda a glicose necessária para o funcionamento cerebral é transferida através das membranas celulares e barreiras por duas classes de transportadores específicos saturáveis, os transportadores de glicose independentes de sódio (GLUT) e transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLT) (SHAH *et al.*, 2012). Os GLUTs são responsáveis pela absorção da glicose do sistema vascular para o cérebro através de três processos, que envolve o transporte através do endotélio que compõe a barreira hematoencefálica (BHE) pela isoforma GLUT1, com peso molecular de 55kDa, para o astrócito, por uma segunda isoforma de 45kDa, que irá transferir a glicose aos neurônios através do GLUT3 (SHAH *et al.*, 2012). Entretanto, a absorção líquida da glicose pelo cérebro dependerá da expressão e atividade do GLUT3, e principalmente das concentrações de glicose nos compartimentos separados pela BHE (DUELLI E KUSCHINSKY, 2001).

O metabolismo de glicose no cérebro tem sido associado ao processo de absorção da mesma, sendo assim determinado pela diferença entre a concentração arteriovenosa através do cérebro multiplicado pelo fluxo sanguíneo cerebral (CUNNANE *et al.*, 2011). Baseado nos dados de absorção de glicose pelo cérebro, HOYER, (1992) revelou que a produção de ATP a partir da glicose é diminuída em 50% dos pacientes com DA esporádico e persiste ao longo da progressão da doença, não sendo observado o mesmo padrão da DA familiar. Esta redução drástica no metabolismo da glicose na DA ocorre mesmo com os mecanismos compensatórios de utilização de outras moléculas endógenas do cérebro, como ácidos graxos e glutamato, que poderia induzir neurotoxicidade por subprodutos tóxicos como a amônia (HOYER E NITSCH, 1989; HOYER *et al.*, 1990; NITSCH *et al.*, 1992; PETTEGREW *et al.*, 1995). Além disso, o envelhecimento é considerado um fator de risco na DA e tanto a utilização como o metabolismo da glicose encontram-se alterados, contribuindo para as alterações na DA, embora não esteja clara a relação da redução do metabolismo de glicose na causa ou consequência da patogênese da DA.

Como já citado, a insulina influencia o metabolismo da glicose nos órgãos periféricos e no SNC de formas particularmente distintas, embora o mecanismo de sinalização utilize uma via conservada através da ligação da insulina a subunidade α do RI, induzindo alterações conformacionais e auto-fosforilação intracelular do RI (SHEMER *et al.*, 1989). Entretanto, a resposta dos tecidos periféricos e do cérebro a insulina difere amplamente, visto que a BHE é impermeável a insulina e como os neurônios expressam os GLUT1 e GLUT3, respectivamente, que não são sensíveis à insulina, razão que resulta no consenso que o metabolismo de glicose no cérebro seja independente de insulina (DODD E TIGANIS, 2017). Embora, a região cerebral do hipocampo expresse o GLUT4, que possui a característica de ser responsivo à insulina, e está diretamente envolvida na formação da memória e cognição (WATSON E CRAFT, 2004).

Como a alta taxa de absorção de glicose no cérebro não segue exclusivamente para produção de energia, uma pequena parcela dessa glicose é utilizada na via de biossíntese de hexosamina, envolvendo a produção de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), que será utilizado como substrato pela UDP-NAc transferase (OGT - Uridina Difosfo-N-Acetil Glusamina:Polipeptídeo β -N-Acetilglucosaminil transferase ou UDP-NAc Transferase) que é necessária na catalise de N-acetil-glucosamina nos resíduos Ser/Thr de proteínas (LOVE E HANOVER, 2005; LIU, F. *et al.*, 2009). O processo de glicosilação de proteínas é uma modificação pós-translacional dinâmica e induzível, responsável pela regulação de diversos processos biológicos, tais como a sinalização da insulina, transcrição e regulação do ciclo celular, processos de estresse celular e degradação proteossômica (ZHANG *et al.*, 2003; LIU, K. *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2012). Ainda, tem sido demonstrado que a O-GlcNAc está envolvida na regulação da via de sinalização da insulina em adipócitos através de modificações nas proteínas IRS1/2 e AKT, aumentando a O-GlcNAcilação em IRS1, que resultará em ligação reduzida a PI3K e menor ativação da AKT em resposta à sinalização de insulina, que resultará em redução da absorção de glicose pelos adipócitos (WHELAN *et al.*, 2010). No cérebro, a diminuição no metabolismo da glicose conduz à uma redução na regulação da O-GlcNAcilação da proteína TAU, resultando em um estado de hiperfosforilação que tem sido apontado como principal fator envolvido na promoção e condução da neurodegeneração na DA (GONG *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2006; CASADESUS *et al.*, 2007; MOSCONI *et al.*, 2008; DENG *et al.*, 2009; IQBAL *et al.*, 2009; LIU, F. *et al.*, 2009; LIU, Y. *et al.*, 2009).

Acredita-se com as atuais observações que a alteração no transporte de glicose para o cérebro seria o responsável pela redução do metabolismo de glicose, resultando na ativação de cinases que desencadeiam uma fosforilação anormal da proteína TAU e/ou degeneração neurofibrilar pela mudança na regulação da biossíntese das hexosaminas. Como observado em cérebros de pacientes com DA os resultados mostraram uma redução drástica nos níveis proteicos de GLUT1 e GLUT3, correlacionando-se com a diminuição nos níveis de O-GlcNAcilação e a hiperfosforilação da TAU (LIU, Y. *et al.*, 2009). A mesma diminuição da O-GlcNAcilação observada no cérebro de paciente com DA, foi encontrado no cérebro de paciente com diabetes melitus tipo 2, principalmente à hiperfosforilação anormal da TAU foi observado, visto que esses pacientes têm um maior risco de desenvolver DA (LIU, Y. *et al.*, 2009).

3. Inflamação na Doença de Alzheimer

A inflamação é uma resposta protetora da microcirculação sanguínea, iniciada após um processo infeccioso e/ou lesão. Definida inicialmente por Celsus através dos quatro sinais cardinais da inflamação, que são calor, dor, rubor e tumor, e posteriormente o quinto sinal cardinal foi incluído pelo farmacologista Virchow, a perda de função tecidual (FULLERTON E GILROY, 2016). Entretanto, a definição clássica aplica-se mais claramente as inflamações localizadas em tecidos periféricos, no cérebro a inflamação é mais complexa e pode envolver diversas vias distintas (MRAK, 2009; VAN EXEL *et al.*, 2009). Assim, os mecanismos inflamatórios que envolvem o cérebro foram ampliados, incluindo invasão de células imunes circulantes e indução ou ativação de mediadores inflamatórios, como cinases, produtos de ciclooxigenase (COX) e citocinas (LUCAS *et al.*, 2006).

A inflamação é uma etiologia intimamente relacionada com o desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a DA. A inflamação observada na DA apresenta a ativação de múltiplos tipos celulares, que são a microglia, astrócitos, macrófagos e linfócitos, e serão responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, neurotransmissores e espécies reativas de oxigênio (EROs) (TANSEY *et al.*, 2007). A presença de placas A β e emaranhados neurofibrilares nos cérebros são responsáveis pelo aumento de células envolvidas na inflamação, astrócito e microglia, além dos níveis de mediadores pró e anti-inflamatórios em pacientes com DA (LEE *et al.*, 2010).

Os processos inflamatórios no SNC são iniciados pela ativação das células microgliais através da liberação de citocinas em resposta a presença de NFT e peptídeos A β , a cronicidade da inflamação e o estado neurotóxicos, que acelera a progressão da doença (SCHWAB E MCGEER, 2008). A microglia é reconhecida como os macrófagos residentes do cérebro, desempenhando um papel de respostas imunes/inflamatórias inatas em diversos distúrbios neurológicos, incluindo a AD (MANDREKAR-COLUCCI E LANDRETH, 2010), a doença de Parkinson (ROGERS *et al.*, 2007), demência do HIV (GARDEN, 2002), esclerose múltipla (MUZIO *et al.*, 2007), esclerose lateral amiotrófica (DEWIL *et al.*, 2007).

A microglia secreta uma quantidade surpreendente de fatores inflamatórios, com potencial de automodulação fenotípica microglial, impactando nos neurônios e seus processos. Estes fatores incluem espécies reativas de oxigênio (CORACI *et al.*, 2002), citocinas pró-inflamatórias (LUE *et al.*, 2001), quimiocinas (EL KHOURY *et al.*, 2003; EL KHOURY *et al.*,

2007), fatores de crescimento (LUE *et al.*, 2001), sistema de complemento (WALKER *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 2001). Ainda, podem expressar os receptores associados à ativação inflamatória, ataque e fagocitose, incluindo receptores de citocinas (AKIYAMA *et al.*, 2000; JOHN *et al.*, 2003), receptores de quimiocinas (CARTIER *et al.*, 2005; EL KHOURY *et al.*, 2007), receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) (WALKER E LUE, 2005), e os receptores Toll-like (TLRs) (LANDRETH E REED-GEAGHAN, 2009).

No SNC, a microglia possui a função neuroprotetora de depuração de fragmentos celulares, agentes infecciosos e na DA de peptídeo A β . Embora a função neuroprotetora da microglia seja sua principal atribuição, em processos patológicos os mecanismos neurotóxicos de ativação contínua e a liberação de fatores tóxicos podem levar à neuroinflamação, e consequentemente torna-se um ponto de partida para progressão da DA (LEE *et al.*, 2010). Esse processo neurotóxico inicia-se pela ativação da microglia que inunda o ambiente celular dos neurônios com EROs, enzimas proteolíticas e outros mediadores inflamatórios, que serão responsáveis pelo aumento na produção e processamentos da forma insolúvel do peptídeo A β . A presença e ligação dos peptídeos A β aos receptores de superfície na microglia podem estimular a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear κ B (NF- κ B), aumentando consequentemente a produção de citocinas e resultando em um estado de inflamação crônica (DEL BO *et al.*, 1995; HALLIDAY *et al.*, 2000; HO *et al.*, 2005).

Os astrócitos são células gliais características com formato estrelado, localizados no SNC e as mais abundantes no cérebro humano (LEE *et al.*, 2010). Os astrócitos estão diretamente envolvidos no suporte de células endoteliais da BHE, mantendo as condições eletroquímicas e nutricionais dos neurônios. Ainda, sugere-se que os astrócitos desempenham papel central na progressão de distúrbios neurodegenerativos, visto que placas amiloides podem ativar astrócitos, resultando na produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e maiores danos astrocíticos na homeostase sináptica e iniciando uma cascata de eventos que levam a lesão neuronal (AGOSTINHO *et al.*, 2010; AVILA-MUNOZ E ARIAS, 2014).

Os astrócitos reativos podem desencadear uma neuropatologia através da expressão e/ou superexpressão de uma gama de fatores inflamatórios, tais como a S100 β , uma neurotrofina indutora de proliferação neurítica em níveis fisiológicos. Entretanto, sua superexpressão foi observada no cérebro de portadores da DA e esses níveis aumentados foram correlacionados com um número aumentado de neuritos distróficos, principalmente nos depósitos de A β (MRAK *et al.*, 1996). Nos animais transgênicos que superexpressam a S100 β , as respostas

inflamatórias observadas após a infusão intraventricular de A β são aumentadas consideravelmente em comparação aos animais tipo-selvagem ou knockout a proteína S100 β (CRAFT *et al.*, 2005).

Os astrócitos, como a microglia expressam e superexpressam proteínas, sofrem modificações morfológicas e funcionais em resposta a lesões no SNC. Uma modificação característica e marcante dos astrócitos é a hipertrofia do corpo celular e seus prolongamentos, com aumento na expressão de filamentos intermediários, constituídos pela proteína glial fibrilar ácida (GFAP), em resposta a quase todas as formas de lesões agudas do SNC, assim como na maioria dos distúrbios neurodegenerativos crônicos (SOFRONIEW E VINTERS, 2010; PARPURA *et al.*, 2012; VERKHRATSKY *et al.*, 2012). As diversas características de ativação astrocitária tem sido relacionadas, tais como a expressão e/ou hiperativação da proteína fosfatase dependente de Ca⁺²/calmodulina (calcineurina), principalmente as mudanças fenotípicas e a sinalização neuroinflamatória inerentes aos astrócitos durante danos e disfunções neurais (NORRIS *et al.*, 2005; SAMA *et al.*, 2008; ABDUL *et al.*, 2010; FURMAN *et al.*, 2016).

Em tecidos periféricos, a calcineurina é o regulador fundamental na transcrição celular, como demonstrado na resposta imune adaptativa através dos fatores de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas) e NF κ B. Estes fatores encontram-se imobilizados no citoplasma, embora por mecanismos distintos, os NFATs estão altamente fosforilados e sua desfosforilação leva a sua translocação e acúmulo no núcleo (RAO *et al.*, 1997). Por sua vez, o NF κ B não é inibido por hiperfosforilação, mas pela ligação com a subunidade inibitória κ B (I κ B) (LIOU E BALTIMORE, 1993), essa unidade inibitória é fosforilada pela I κ B cinase ativada pela ação da calcineurina. Estes processos distintos, mas que envolvem a ação da calcineurina permite a translocação do NFAT e do NF κ B para o núcleo e direcionam a expressão de múltiplas citocinas, promovendo a expansão clonal das células T.

Nos astrócitos, a calcineurina tem representando um possível elo entre mudanças morfológicas e a sinalização imune/inflamatória, promovendo o fenótipo ativado por meio da desfosforilação do fator de transcrição NFAT (CRABTREE E OLSON, 2002; HORSLEY E PAVLATH, 2002). Diferentes fatores extracelulares podem induzir a hipertrofia astrocitária e/ou neuroinflamação, tais como as citocinas pró-inflamatórias, glutamato, ATP, S100 β e A β , além de ativarem a sinalização calcineurina/NFAT e que estão diretamente ligados a DA (FERNANDEZ *et al.*, 2007; CANELLADA *et al.*, 2008; SAMA *et al.*, 2008; ABDUL *et al.*, 2009;

ABDUL *et al.*, 2010). Entretanto, a hiperativação da calcineurina/NFAT no astrócito induz a transcrição de diversas vias envolvidas no envelhecimento e fases iniciais da DA (NORRIS *et al.*, 2005).

Os NFATs existem em cinco isoformas, sendo quatro dependentes da calcineurina, NFATc1-c4 e expressas no cérebro de mamíferos (NGUYEN E DI GIOVANNI, 2008; VIHMA *et al.*, 2008). A ativação dos NFATs é diretamente regulada pelo nível intracelular de cálcio, podendo ocorrer pelo influxo através dos canais de cálcio tipo L ou pelos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (GRAEF *et al.*, 1999). Ainda, o IP₃ formado pela hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), conduz a liberação de cálcio intracelular a partir do retículo endoplasmático. O cálcio intracelular liga-se a calmodulina, ativando a calcineurina e desfosforilando os NFAT (GRAEF *et al.*, 2001). Essas alterações na expressão e atividade do NFAT, especialmente para as isoformas NFATc1 e c4, foram observadas em astrócitos sobre condições neurodegenerativas progressivas, como a DA (ABDUL *et al.*, 2009) e a doença de Parkinson (CARAVEO *et al.*, 2014), como também após lesão agudas do SNC (SERRANO-PEREZ *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2014). A interrupção na interação calcineurina/NFAT em astrócitos por manipulação gênica, peptídeos miméticos (VIVIT) e drogas imunossupressoras (ciclosporina e FK-506) suprimiram a ativação glial, reduziram os danos provocados pelo peptídeo amilóide e melhorou a função sináptica em modelos animais da DA, sugerindo que a sinalização calcineurina/NFAT em astrócitos pode ser prejudicial a função neural em condições neurodegenerativas (FURMAN *et al.*, 2012).

4. Modelo Animal da Doença de Alzheimer

Os modelos animais desempenham um papel central nos processos de descoberta e desenvolvimento de estratégias terapêuticas, caracterização fisiopatológica de doenças, avaliação dos mecanismos de ação de fármacos, descoberta de alvos e biomarcadores (ANDERSON E KODUKULA, 2014). O desenvolvimento de um modelo animal exige o preenchimento de requisitos técnicos, como replicar os fenômenos da doença humana e sua causalidade, em termos de um mecanismo de ação que possua alto grau de fidelidade com aqueles observados na doença humana (MCGONIGLE E RUGGERI, 2014).

A DA é um desafio constante na pesquisa, visto que a etiologia e questões fundamentais continuam desconhecidas, principalmente no campo da ciência básica. Neste contexto, tanto a pesquisa básica quanto nos campos translacionais, os modelos animais da doença são essenciais. Os modelos animais genéticos e não-genéticos da patologia tornaram-se ferramentas de pesquisa importantes para descobrir vias e alvos da doença, bem como testar novas abordagens terapêuticas (ASHE E ZAHS, 2010; LAFERLA E GREEN, 2012).

Um modelo animal da DA amplamente utilizado e estudado é o modelo transgênico triplo, 3xTg-AD, que desenvolve ambas características morfológicas observadas na doença, as placas amiloides e NFTs de maneira idade/região dependentes (ODDO, CACCAMO, KITAZAWA, *et al.*, 2003; ODDO, CACCAMO, SHEPHERD, *et al.*, 2003; MASTRANGELO E BOWERS, 2008). Neste modelo, os depósitos A β são observados após seis meses de idade, enquanto os emaranhados neurofibrilares são encontrados ao décimo segundo mês de idade (ODDO, CACCAMO, KITAZAWA, *et al.*, 2003; CLINTON *et al.*, 2007). Entretanto, os déficits de memória iniciam-se em torno do quarto mês de idade (BILLINGS *et al.*, 2007).

Os modelos animais de demência não-transgênicos ou farmacológicos tendem a utilizar disfunções em vias neurotransmissoras visando mimetizar as alterações prevalentes em indivíduos que desenvolveram a DA. Diversos modelos foram propostos na tentativa de explicar estas alterações, destacando-se a infusão de ibotenato no núcleo basal magnocelular, que compromete as eferências colinérgicas dessa região (SWAROWSKY *et al.*, 2008); a infusão do peptídeo A β via intracerebroventricular (ICV) (ZUSSY *et al.*, 2011); a oclusão permanente das carótidas comuns, causando uma hipoperfusão encefálica crônica (VICENTE *et al.*, 2009); a infusão ICV bilateral da toxina botulínica (LACKOVIC *et al.*, 2009); a infusão intrahipocampal bilateral (COSTA *et al.*, 2012) e ICV de ácido ocadáico (BROETTO *et al.*,

2016) e a infusão bilateral ICV de estreptozotocina (STZ) (RODRIGUES *et al.*, 2009; TRAMONTINA *et al.*, 2011; BIASIBETTI *et al.*, 2017).

O modelo de STZ ICV baseou-se no comprometimento metabólico cerebral de glicose e aminoácidos observados após o início clínico da DA (HOYER E NITSCH, 1989), e um possível prejuízo nos receptores de insulina-insulina cerebral, resultando em distúrbios catabólicos (HOYER E NITSCH, 1989). A STZ é um composto natural, produzido pela bactéria *Streptomyces acromogenes*, e utilizado para induzir ambos diabetes dependente e não-dependente de insulina (EILEEN DOLAN, 1997). Essa observação foi realizada no ano de 1963, (RAKIETEN *et al.*, 1963), que relataram os efeitos diabetogênicos da STZ, por sua ação citotóxica as células β pancreáticas de forma dose-dependente e em curto tempo após a administração (JUNOD *et al.*, 1967).

A STZ é um análogo estrutural da glicose e N-acetil glucosamina, sendo prontamente absorvida pelas células β pancreáticas através do transportador GLUT 2, onde provoca a morte celular por metilação e fragmentação do DNA, resultando na ativação da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), esgotando os estoques celulares de NAD^+ e ATP em resposta aos mecanismos de reparo (PIEPER *et al.*, 1999). Ainda, a STZ aumenta a atividade da guanilato ciclase e formação do cGMP, características claras da ações do óxido nítrico (NO) (TURK *et al.*, 1993). Entretanto, a STZ inibe seletivamente a atividade da hidrolase de glicosídeo, O-GlcNAcase, que cliva as ligações β -O-GlcNAc (O-GlcNAc) em proteínas, causando a deficiência na remoção de O-GlcNAc e ocasionando a O-glicosilação irreversível de proteínas resultando em apoptose celular (KONRAD *et al.*, 2001; KRENTZ, 2003).

Alterações moleculares e comportamentais têm sugerido que a resistência à insulina no cérebro está presente, tanto no diabetes tipo 2 como na DA (STEEN *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2011). A administração ICV de STZ proposto por Hoyer et al. (MAYER *et al.*, 1990; NITSCH E HOYER, 1991; NITSCH *et al.*, 1992) inibe o sistema cerebral do receptor insulina-insulina e, conseqüentemente, diminui a utilização de glicose pelo cérebro (NITSCH E HOYER, 1991). As evidências tem mostrado que a DA possui características que permite classifica-la como um tipo cerebral específico de *diabetes mellitus* chamada "diabetes tipo 3" (STEEN *et al.*, 2005; DE LA MONTE E WANDS, 2008). O sistema de transdução de sinal da insulina exerce papel importante tanto na manutenção dos níveis quanto na regulação do metabolismo neuronal de glicose e na geração de energia e na manutenção dos processos de aprendizagem e memória (SCHULINGKAMP *et al.*, 2000; PARK, 2001; GEROZISSIS, 2003; HOYER, 2004).

O modelo de infusão ICV da STZ propõe a utilização de dose subdiabetogênicas, variando entre 1,5 a 3mg/kg, infundidas em dose única ou por três dias consecutivos. Ambos os protocolos demonstraram diminuição da glicose cerebral, principalmente no córtex frontal e parietal, das concentrações de ATP e fosfocreatina, da relação ATP/ADP e a carga energética do córtex desses animais (NITSCH E HOYER, 1991). O modelo demonstrou desenvolver resistência à insulina no cérebro, diminuição do metabolismo de glicose, danos colinérgicos, estresse oxidativo, gliose, taupatia e acúmulo do A β , resultando em redução na aprendizagem e provocando déficits de memória (SALKOVIC-PETRISIC E HOYER, 2007; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2009; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013). Embora o mecanismo associado a resistência cerebral à insulina seja bem aceito, ainda não foi robustamente comprovado por dados experimentais (GRIEB, 2016). Além disso, o estresse oxidativo e neuroinflamação subsequentes que levam à morte neuronal é proposto como um segundo mecanismo da STZ ICV (SHARMA E GUPTA, 2001; BASSANI *et al.*, 2017).

Objetivos

Objetivo Geral

Levando em consideração os pontos supracitados, a presente tese visou esclarecer as possíveis alterações patofisiológicas, comportamentais e moleculares observadas na neurodegeneração induzida pela infusão intracerebroventricular da estreptozotocina em ratos *Wistar*.

Objetivos Específicos

Capítulo I

- Comparar do déficit cognitivo de ratos submetidos a injeções intracerebroventricular da estreptozotocina;
- Comparar a mudança temporal no imunocontéudo da proteína OGT;
- Comparar a mudança temporal no estado de fosforilação da proteína IRS-1;
- Comparar a mudança temporal no fluxo de glicose:
 - Por captação de glicose no hipocampo dos animais;
 - Estado de glicosilação de proteínas totais do hipocampo dos animais;
 - Atividade do complexo de detoxificação glioxalase;
- Comparar a mudança temporal em marcadores da função astrocitária hipocampal:
 - Conteúdo de expressão das proteínas GFAP, S100B e GS;
 - Níveis liquóricos da proteína S100B;
 - Conteúdo de glutathiona reduzida;

Capítulo II

- Comparar a mudança temporal na expressão e estrutura da proteína calcineurina;
- Comparar a mudança temporal na sinalização *downstream* da calcineurina:
 - Estado de fosforilação da proteína BAD;
 - Translocação nuclear das isoformas NFATc3 e c4;
- Comparar a mudança temporal em marcadores inflamatórios:
 - Translocação nuclear do NFκB
 - Expressão da proteína induzível COX-2;
- Comparar a mudança temporal na ativação da microglia:
 - Expressão da proteína marcadora IBA-1;
 - Expressão da proteína TLR-4

Parte II

Capítulo 1

Early and persistent O-GlcNAc protein modification in the streptozotocin model of Alzheimer's disease

Manuscrito 17-0211R2 aceito para publicação no periódico:

Journal of Alzheimer's Disease (JAD)

ISI Journal Citation Report 2017: 3.731

Qualis Capes Quadriênio (2013-2016): A2

Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease

João Paulo Almeida dos Santos, Adriana Vizuete, Fernanda Hansen, Regina Biasibetti and Carlos-Alberto Gonçalves

Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Accepted 6 September 2017

Abstract. O-GlcNAc transferase (OGT), an enzyme highly expressed in brain tissue, catalyzes the addition of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to hydroxyl residues of serine and threonine of proteins. Brain protein O-GlcNAcylation is diminished in Alzheimer's disease (AD), and OGT targets include proteins of the insulin-signaling pathway (e.g., insulin receptor substrate-1, IRS-1). We hypothesized that ICV streptozotocin (STZ) also affects O-GlcNAc protein modification. We investigated hippocampal metabolic changes in Wistar rats, particularly OGT levels and insulin resistance, as well as related astroglial activities, immediately after ICV STZ administration (first week) and later on (fourth week). We found an early (at one week) and persistent (at fourth week) decrease in OGT in the ICV STZ model of AD, characterized by a spatial cognitive deficit. Consistent with this observation, we observed a decrease in protein O-GlcNAc modification at both times. Increased phosphorylation at serine-307 of IRS-1, which is related to insulin resistance, was observed on the fourth week. The decrease in OGT and consequent protein O-GlcNAc modifications appear to precede the decrease in glucose uptake and increment of the glyoxalase system observed in the hippocampus. Changes in glial fibrillary acidic protein and S100B in the hippocampus, as well as the alterations in cerebrospinal fluid S100B, confirm the astroglial dysfunction. Moreover, decreases in glutamine synthetase and glutathione content suggest astroglial dysfunction, which are likely implicated in the neurodegenerative cascade triggered in this model. Together, these data contribute to the understanding of neurochemical changes in the ICV STZ model of sporadic AD, and may explain the decreases in protein O-GlcNAc levels and insulin resistance observed in AD.

Keywords: Astrocyte, GFAP, hippocampus, insulin-resistance, O-GlcNAc transferase, streptozotocin, S100B

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) progresses to serious and disabling cognitive impairment, causing enormous social and economic damage [1, 2]. From a histopathological point of view, AD is characterized by extracellular deposits of amyloid- β (A β) peptides (senile plaques), derived from neuron membrane amyloid- β protein precursor (A β PP), and the derangement of neuronal microtubules

(neurofibrillary tangles) due to hyperphosphorylation of the tau protein. Such histopathological alterations are accompanied and/or preceded by changes in glucose metabolism and astroglial dysfunction [3]. Late-onset or sporadic AD is found in more than 98% of cases and causes remain elusive.

Both A β PP and tau protein are enzymatically modified by N-acetylglucosamine (GlcNAc) in addition to hydroxyl residues of serine and threonine (O-GlcNAc). The addition of O-GlcNAc is catalyzed by uridine diphosphate-N-acetyl-D-glucosamine:polypeptidyl transferase or O-GlcNAc transferase (OGT), which has a trimeric structure comprising two subunits of 110 kDa and one of

¹Correspondence to: Carlos-Alberto Gonçalves, Av Ramiro Barcelos, 2600-anexo, Lab Calcium Binding Proteins in CNS, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Brazil. E-mail: casg@ufrgs.br.

78 kDa [4]. This enzyme is ubiquitous, but is highly expressed in the pancreas and brain tissue [5]. The post-translational modification by OGT is dependent on glucose flux through the hexosamine biosynthetic pathway [6].

Therefore, considering the altered glucose metabolism and insulin-resistance observed in AD, it would be interesting to evaluate possible changes in O-GlcNAc protein modification in an animal model of AD. Protein O-GlcNAcylation is reportedly diminished in AD brain tissue [7] and this may be due to reduced glucose flux [6]. Moreover, molecular data of insulin resistance indicate an alteration in O-GlcNAc protein modification, as OGT is able to modify the activities of insulin receptor substrates (IRS) and other downstream targets (e.g., Akt) [8]. Consistent with this hypothesis, there is much evidence to suggest a potential involvement of O-GlcNAc protein modification in AD and other neurodegenerative diseases (see [9] for a review).

Intracerebroventricular (ICV) administration of streptozotocin (STZ) has been used as a valuable model for AD, suitable for understanding neurochemical alterations and the development of therapeutic strategies (see [10] for a review). STZ is an analog of GlcNAc and is able to inhibit the enzyme, O-GlcNAcase (OGA), which removes the GlcNAc residue from proteins [11, 12]. This compound may stimulate OGT activity; however, in diabetic rats (induced by intraperitoneal STZ administration), a decrease in OGT activity and an increase in OGA have been reported [13]. A decrease in protein O-GlcNAcylation was reported in the STZ model of AD in the cerebrum of rats, but not in the cerebellum [14]. More recently, a study using this model of AD reported no changes in the gene expression (mRNA levels) of OGT in mouse hippocampus [15].

Considering the astrocyte dysfunction that precedes and/or accompanies AD, we have investigated astroglial parameters in the STZ model of sporadic AD in rats [16–18]. We found cognitive impairment and a decreased glucose uptake in these animals, in association with signs of astrocyte dysfunction, such as decreased cerebrospinal fluid (CSF) S100B levels at 4–6 weeks after ICV STZ. We hypothesized that ICV STZ affects O-GlcNAc protein modification in these rats, and that this, together with astroglial dysfunction, contributes to the cognitive impairment observed. In the present study, our aim was to investigate hippocampal metabolic changes in the STZ-induced model of AD, particularly OGT

protein levels and insulin resistance, as well as related astroglial activities, immediately after STZ administration (first week) and later on, after administration (fourth week).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Streptozotocin, methylglyoxal, standard reduced glutathione (GSH), o-phthalaldehyde (OPA), o-phenylenediamine (OPD), meta-phosphoric acid, cytochalasin B, anti-S100B (SH-B1) and anti-O-linked-N-acetylglucosamine transferase (OGT) were purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA). 2-Deoxy-D-Glucose-3H(G) was purchased from American Radiolabeled Chemicals, Inc. (Saint Louis, MO, USA). Polyclonal anti-S100B, anti-GFAP and anti-rabbit peroxidase-linked antibodies were purchased from DAKO (São Paulo, Brazil) and GE, respectively (Little Chalfont, United Kingdom). Primary antibody anti-phospho-IRS1, anti-panIRS1, anti-O-linked N-Acetylglucosamine (RL2), and anti-Actin were purchased from EMD Millipore (Darmstadt, Germany) and anti-glutamine synthetase (GS) was from Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA). All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

Animals

A total of a forty male Wistar rats (90–120 days old) were obtained from our breeding colony (at the Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul), and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to food and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80–23) revised 1996, and following the regulations of the local animal house authorities.

Rats were divided into two groups: Sham and STZ. After the first week (1 w) and behavioral tasks in the fourth week (4 w), rats were anaesthetized for CSF puncture and hippocampi were dissected. Transverse slices of hippocampi were prepared for the glucose uptake assay or were immediately frozen and stored at -80°C , for the subsequent evaluation of S100B and glial fibrillary acidic protein (GFAP)

contents, Glyoxalase 1 (GLO1) activity, GSH content and OGT protein and GlcNAc-protein levels, phospho-IRS1/pan-IRS1, and glutamine synthetase content.

Surgical procedure

Streptozotocin was intracerebroventricularly infused, based on previous studies [16, 18]. Briefly, on the day of the surgery, animals were anesthetized with ketamine/xylazine (80 and 10 mg/kg, respectively, IP) and placed in a stereotaxic apparatus. A midline sagittal incision was made in the scalp. The lateral ventricles were accessed using the following coordinates: 0.9 mm posterior to bregma; 1.5 mm lateral to sagittal suture; 3.6 mm beneath the surface of the brain. Rats received a single bilateral infusion of 5 μ L STZ (3 mg/kg) or vehicle (Hank's balanced salt solution – HBSS – containing in mM: 137 NaCl; 0.63 Na_2HPO_4 ; 4.17 NaHCO_3 ; 5.36 KCl; 0.44 KH_2PO_4 ; 1.26 CaCl_2 ; 0.41 MgSO_4 ; 0.49 MgCl_2 and 10 glucose, in pH 7.4) using a Hamilton syringe. After the surgical procedure, rats were placed on a heating pad to maintain body temperature at $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and were kept there until recovery from anesthesia. The animals were submitted to behavioral tasks at 3 weeks after STZ infusion and biochemical analysis at 1 and 4 weeks after STZ injection. A schematic design of the experimental procedure is shown in Fig. 1, indicating times of surgery (STZ or vehicle infusion), cognitive behavior and biochemical analysis.

Morris water maze test

Spatial learning and memory of animals were tested in the Morris water maze. The test began three weeks from STZ injection [18, 19]. The apparatus consisted of a circular pool (180 cm diameter, 60 cm high) filled with water (depth 30 cm; $25 \pm 1^\circ\text{C}$),

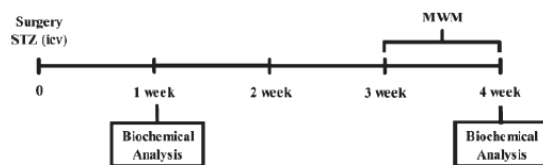


Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocol. Adult Wistar rats were submitted to ICV STZ administration, assumed as time 0. Neurochemical analyses (in the hippocampus tissue and cerebrospinal fluid) were performed at one week or 4 weeks afterwards. Cognitive analysis by Morris water maze (MWM) was performed only during the last week.

placed in a room with consistently-located spatial cues. An escape platform (10 cm diameter) was placed in the middle of one of the quadrants, 2 cm below the water surface, equidistant from the sidewall and the middle of the pool. The platform provided the only escape from the water and was located in the same quadrant every trial. Four different starting positions were equally spaced around the perimeter of the pool. The rats were placed for four trials (once from each starting position) per session for 5 days, where each trial had a ceiling time of 60 s. The inter-trial interval was 10 min. After each trial, the rats were dried, and returned to their cages at the end of the session. At 24 h after the last training session, the rats were submitted to a test session. Before this session, the submerged platform was removed. The retention test consisted of placing the animals in the water for 60 s. The time to reach the platform (latency in seconds) was measured. The number of crossings over the original position of the platform and time spent in the target quadrant, compared to the opposite quadrant, were measured.

Western blotting

Hippocampi were quickly removed, homogenized in RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ leupeptin, 1 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5), and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatants were collected and protein concentration was measured using the Lowry method [20]. To obtain representative western blots, equal amounts of lysates of each hippocampus were loaded per lane on 8% and 10% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA). Membranes were blocked for 2 h in 5% Tris-buffered saline with Tween 20[®] (TTBS) and bovine serum albumin (BSA). Western immunoblot analysis was performed using anti-IRS1 (1 : 1000, EMD Millipore) and anti-phospho-IRS1 (p-IRS1) Ser307 (1 : 1000, EMD Millipore), anti-OGT (1 : 1000, Sigma), anti-GS (1 : 1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-O-Linked GlcNAc (1 : 1000, EMD Millipore), and anti-Actin (1 : 2000, EMD Millipore) antibodies. Secondary antibodies used were horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (1 : 10,000, Dako) and anti-rabbit IgG (1 : 10,000, Millipore). Chemiluminescent bands were detected using ImageQuant LAS4000 GE Healthcare, and densitometric analyses

were performed using Image-J software. Results are expressed as percentages of the control.

Quantification of S100B and GFAP

The S100B contents in the CSF and hippocampal slice were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described previously [21]. Briefly, 50 μ L of sample plus 50 μ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate that was previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.02 to 10 ng.mL⁻¹. ELISA for GFAP in the hippocampal slice was carried out by coating the microtiter plate with 100 μ L samples overnight at 4°C. Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 7.5 ng.mL⁻¹ [22].

Glucose uptake assay

Glucose uptake was measured in hippocampal slices, as previously standardized [23]. Briefly, slices were incubated for 30 min at 37°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS). The assay was started by the addition of 0.1 μ Ci/mL 2-Deoxy-D-Glucose-3H(G). The incubation was stopped after 30 min by the removal of the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Non-specific uptake was determined using 10 μ M cytochalasin B. Final glucose uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake from the total uptake to obtain the specific uptake.

Glyoxalase 1 activity assay

Slices were lysed and homogenized in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. Subsequently, slices were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4°C and the supernatant was used for enzymatic activity and protein content measurements. GLO1 activity was assayed according to [24]. The reaction mixture contained 50 mM sodium-phosphate buffer pH 7.2, 2 mM methylglyoxal and 1 mM GSH (pre-incubated for 30 min at room temperature). Protein from the sample was added to the buffer. The formation of

S-(d)-lactoylglutathione was linear and monitored at 240 nm for 15 min at 30°C. A unit of GLO1 activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of S-(d)-lactoylglutathione per minute. Specific activity was calculated in milliunits per milligram of protein (mU.mg⁻¹ protein).

Reduced glutathione (GSH) content assay

The glutathione content was determined as described [25]. The hippocampal slices were homogenized in a 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA and the protein was precipitated with 1.7% metaphosphoric acid. The supernatant was assayed with OPA (at a concentration of 1 mg.mL⁻¹ methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard GSH solutions at concentrations ranging from 0 to 500 μ M. GSH concentrations were calculated as nmol.mg⁻¹ protein. Results are expressed as nmol.mg⁻¹ protein.

Statistical analysis

Data are reported as the mean \pm standard error, the Morris water maze task was analyzed statistically by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test, when the *F*-test was significant. An unpaired Student's *t*-test was used for comparing the two samples. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$ (indicated by one asterisk or two, when $p < 0.01$). All analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad).

RESULTS

STZ-induced dementia causes cognitive and ponderal deficit

One week after ICV-STZ treatment, rats exhibited a decrease in body weight (Fig. 2A, $p = 0.0001$). This decrease became discrete at 4 weeks, although it remained significant (Fig. 2B, $p = 0.0001$). However, no changes in glycemia or signs of undernutrition were observed in these animals (data not shown). Cognitive performance was evaluated in the Morris water maze. There was a decline in the average time to find the platform during training (escape latency), from day 2 onwards, only in the sham group (Fig. 2C) ($F(4, 36) = 8.511$; $p = 0.0001$). In

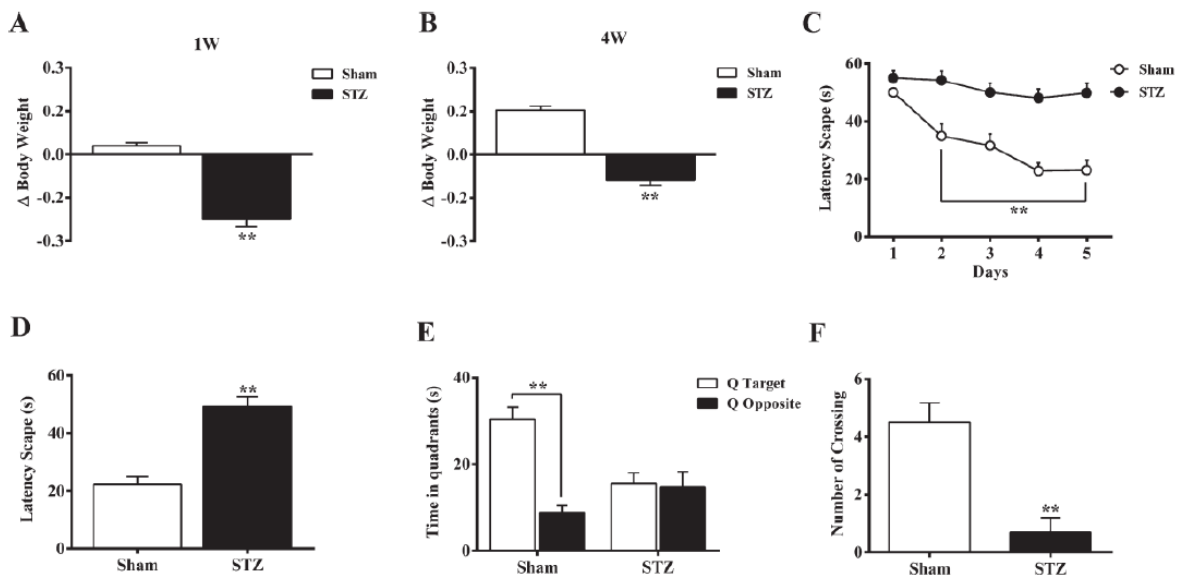


Fig. 2. Body weight changes and cognitive performance of rats submitted to ICV STZ models of AD. All animals were weighed at time 0, before vehicle (sham) or STZ administration, and later at 1 and 4 weeks, before euthanasia. Differences in body weights in grams (O) at 1 and 4 weeks are represented in A and B, respectively. C shows the latency escape in MWM during the 5 consecutive days of training; D shows the latency escape on the test day. Times in the target and opposite quadrant (Q) of the water tank are shown in E, and number of crossings over the target are shown in F. Values are means \pm standard error of 10 rats in each group. * Significant differences from the sham group by Student's *t* test or two-way ANOVA (C and E), $p < 0.05$.

the test group, escape latency was clearly different between groups (Fig. 2D, $p = 0.0001$). In addition, STZ rats spent less time in the target quadrant, as compared to the sham group (Fig. 2E, F (1, 18) = 14.23; $p = 0.0014$). The number of crossings over the platform location was significantly lower in the STZ group, compared to the sham group (Fig. 2F, $p = 0.0002$).

Hippocampal OGT is reduced in the STZ-model of AD

The immunoccontent of OGT in the hippocampus of rats after ICV administration of STZ was reduced within first week after administration (Fig. 3A, $p = 0.0104$) and remained reduced in the fourth week (Fig. 3B, $p = 0.0425$). We then investigated IRS-1, a target of OGT, by measuring IRS-1 phosphorylation at the Ser 307 site, which is related to insulin resistance. We found an increase in phosphorylation at Ser 307, at 4 weeks ($p = 0.0047$) (Fig. 3C, D). However, we did not observe differences in the amount of total IRS-1 among the groups and times (Fig. 3E, $p = 0.9861$ and Fig. 3F, $p = 0.9214$, respectively). The phospho-IRS-1/IRS-1 ratio (Fig. 3G, H) demonstrates a clear increase in IRS-1 phosphorylation at the fourth week ($p = 0.0296$).

Glucose flux is altered in the STZ-model of AD

Insulin resistance in the brain tissue is accompanied by changes in glucose transport and metabolism. In association with the decrease in OGT protein level, we observed a decrease in protein O-GlcNAc modification in hippocampal tissue at one week ($p = 0.0485$) and four weeks ($p = 0.0052$) after ICV STZ administration (Fig. 4A, B). Note that quantification refers to the value of all detected bands and it is possible to observe changes that are specific for each band. We found a decrease in hippocampal glucose uptake at 4 weeks after STZ infusion ($p < 0.0001$), that was not observed earlier on at one week ($p = 0.3430$) (Fig. 4C, D). Moreover, we also found an increase in hippocampal glyoxalase 1 (GLO 1) activity at 4 weeks after STZ treatment ($p = 0.0213$), which was not seen earlier on ($p = 0.7143$) (Fig. 4E, F). GLO 1 is a key enzyme in the glyoxalase system, and is responsible for converting methylglyoxal (a subproduct of the glycolytic pathway) to lactate. GLO 2 activity was not altered at 1 or 4 weeks (data not shown).

Changes in astrocyte markers in the STZ-model of AD

Glucose transport and metabolism to lactate (including from methylglyoxal) mainly occur in

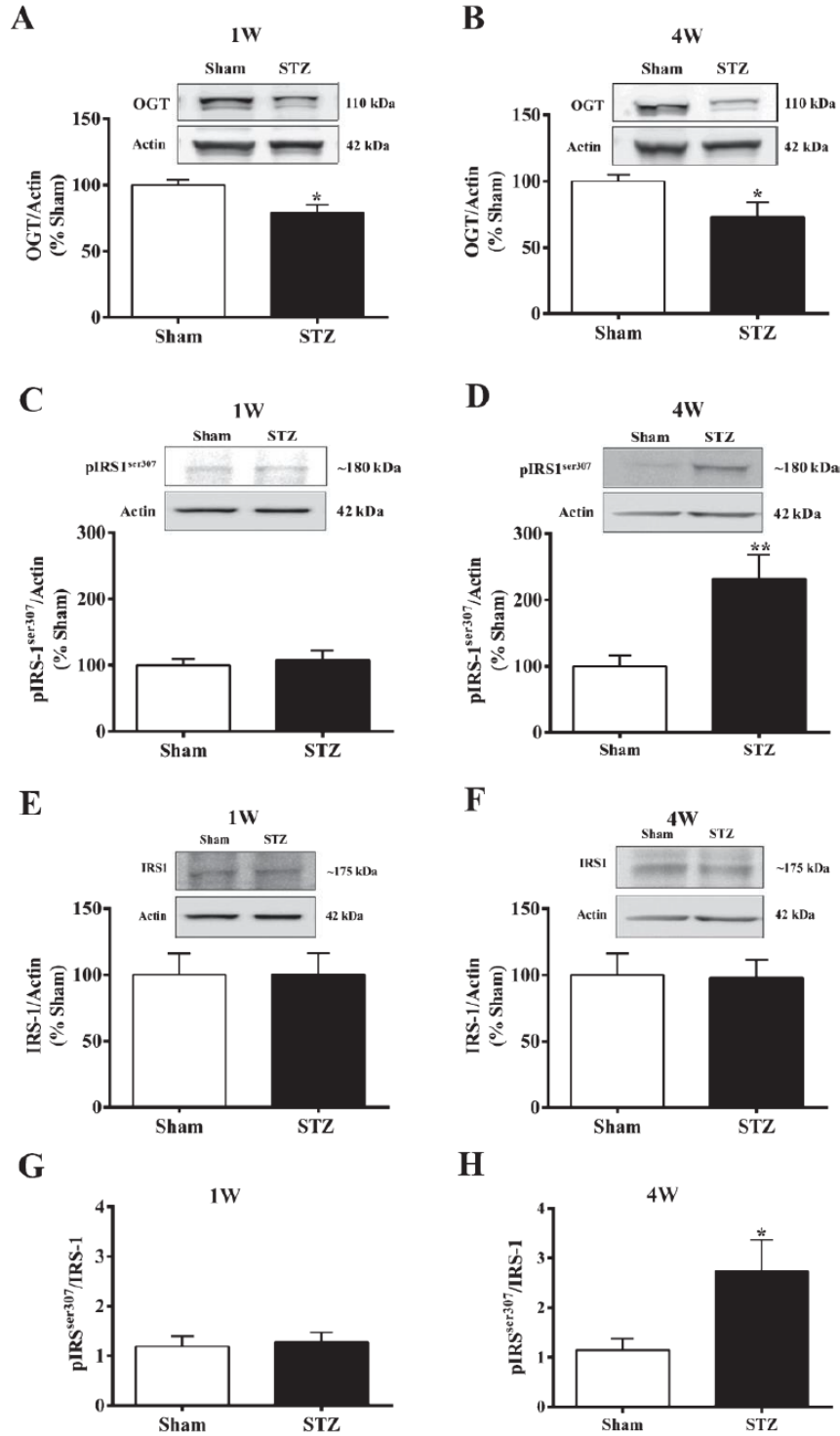


Fig. 3. Hippocampal OGT content and IRS-1 phosphorylation changes at 1 and 4 weeks after ICV STZ administration. A, B) Immunocontents of hippocampal OGT, as determined by western blotting, normalized by actin, and assuming Sham samples as 100%, at 1 or 4 weeks after ICV STZ administration, respectively. C, D) Hippocampal phosphorylation of IRS-1 at the serine 307 site, at 1 and 4 weeks, respectively. Phosphorylation was determined by western blotting, which was normalized by actin with sham samples assumed as 100%. Total IRS-1 contents at 1 and 4 weeks are shown in E and F. IRS-1 phosphorylation at ser 307/IRS-1 at 1 and 4 weeks are shown in G and H, respectively. Values are means \pm standard error of 9 rats in each group. * Significant differences from the sham group by Student's *t* test, $p < 0.05$.

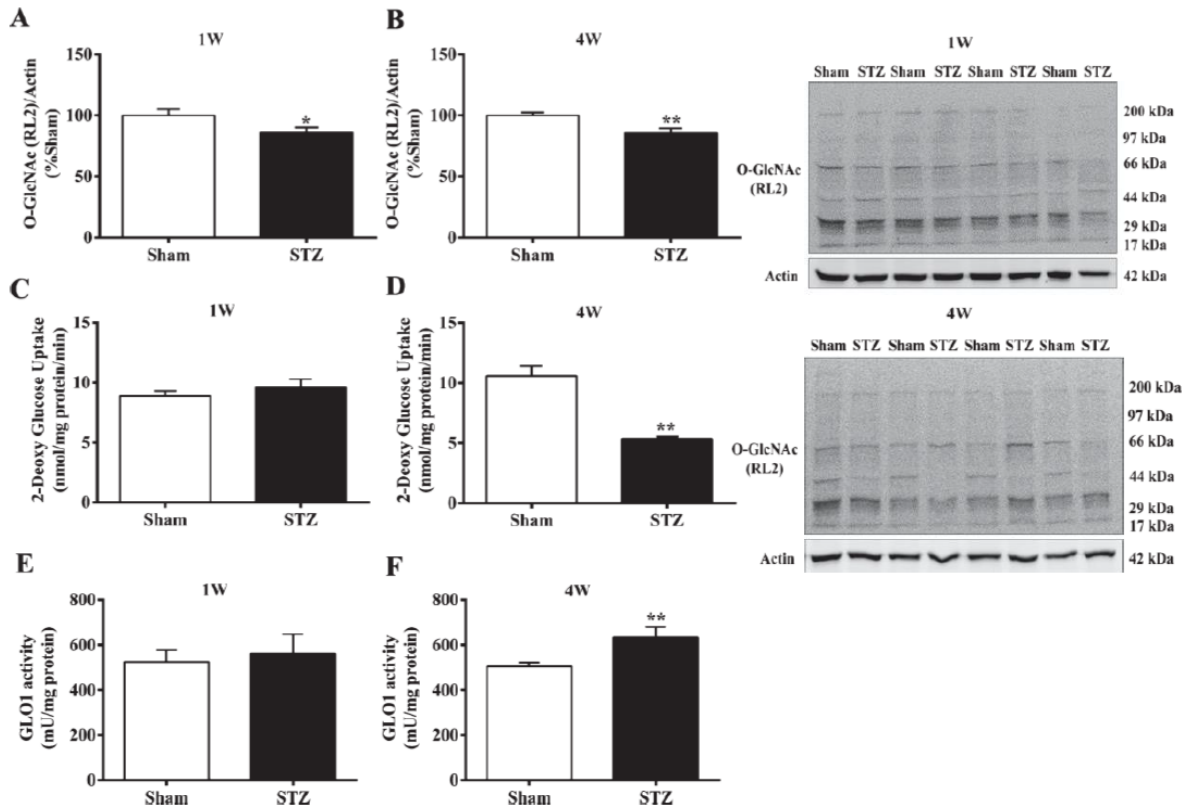


Fig. 4. Protein O-GlcNAcylation, glucose uptake and glyoxalase 1 activities in ICV STZ-treated rats. Protein O-GlcNAc levels were determined by immunoblotting at 1 and 4 weeks (A and B, respectively) after ICV STZ administration. Quantification refers to the value of all detected bands in the lane. Representative immunoblots are shown below. Glucose uptake and glyoxalase-1 activity were determined in hippocampus tissues at 1 or 4 weeks after ICV STZ treatment by deoxy-3H-glucose incorporation and lactoylglutathione formation, respectively. Changes in glucose uptake measured in nmol of deoxy-3H-glucose/mg protein/min, at 1 and 4 weeks, are shown in C and D, respectively. E and F show the activities of glyoxalase-1 (GLO-1), measured in milliunits per milligram of protein, at 1 and 4 weeks. Values are means \pm standard error of 9 rats in each group. * Significant differences from the sham group by Student's *t* test, $p < 0.05$.

astrocytes. Two specific astroglial markers, GFAP and S100B, were evaluated. We observed an increase in hippocampal GFAP at one ($p = 0.0053$) and four ($p = 0.0153$) weeks after ICV STZ administration (Fig. 5A and B, respectively). On the other hand, a decrease was observed in hippocampal S100B at one week after STZ treatment ($p = 0.0335$), but an increase was seen at four weeks ($p = 0.0234$) (Fig. 5C and D, respectively). Moreover, S100B is secreted and extracellular changes also indicate astrocyte activation and/or dysfunction. In fact, we found an increase in cerebrospinal (CSF) S100B at one week ($p = 0.0010$), but a decrease in this protein in CSF, later on ($p = 0.0321$) (Fig. 5E, F).

Changes in other biomarkers suggest astrocyte dysfunction

Two markers of astroglial activity were also investigated: glutamine synthetase (GS) and glutathione

(GSH) content. GS is a specific astrocyte enzyme responsible for the conversion of glutamate to glutamine, which is transported to neurons as a source for neurotransmitter synthesis (glutamate or GABA). We observed a decrease in GS content at one ($p = 0.0364$) and four ($p = 0.0022$) weeks after ICV STZ administration (Fig. 6A and B, respectively). Although GSH content is not a specific marker of astrocytes, its brain synthesis and recycling is fully dependent on astrocyte activity. We observed a decrease in GSH in the STZ-model of AD within one week ($p = 0.0226$), which was maintained at four weeks ($p = 0.0075$) (Fig. 6C, D).

DISCUSSION

AD is the most common type of dementia. AD patients exhibit progressive changes in memory and

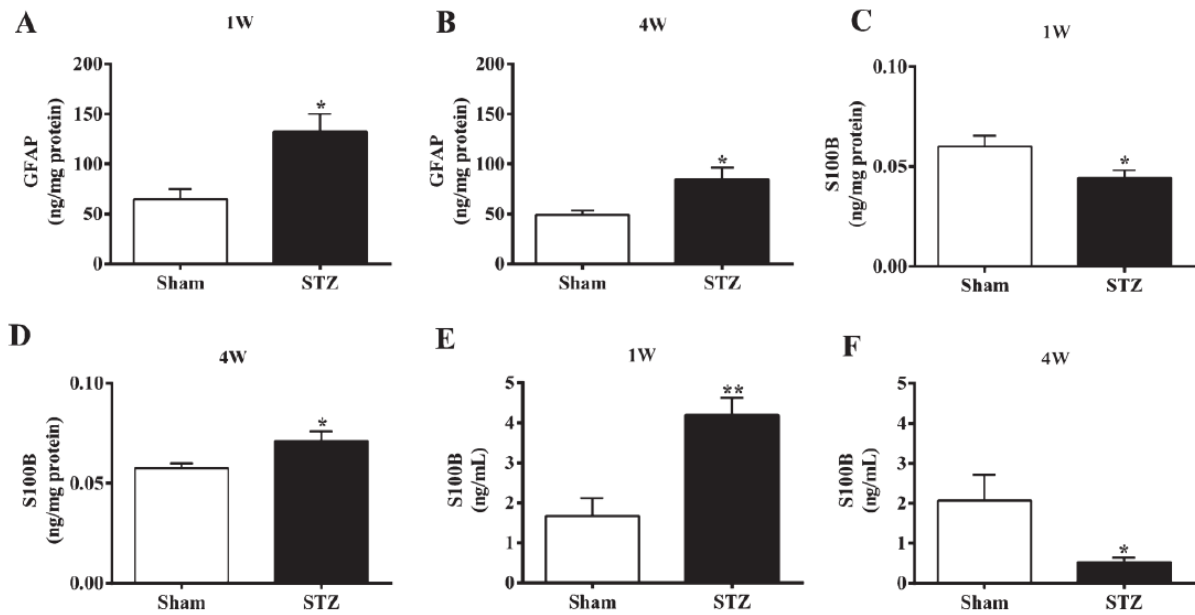


Fig. 5. Changes in astrocyte markers at 1 and 4 weeks after ICV STZ administration. Hippocampal Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100B, and cerebrospinal fluid (CSF) content of S100B were measured by ELISA. A, B) GFAP contents at 1 and 4 weeks after STZ administration, respectively. C, D) S100B content. E, F) CSF S100B concentrations. Values are mean \pm standard error of 8-9 rats in each group. * Significant differences from the sham group by Student's *t* test, $p < 0.05$.

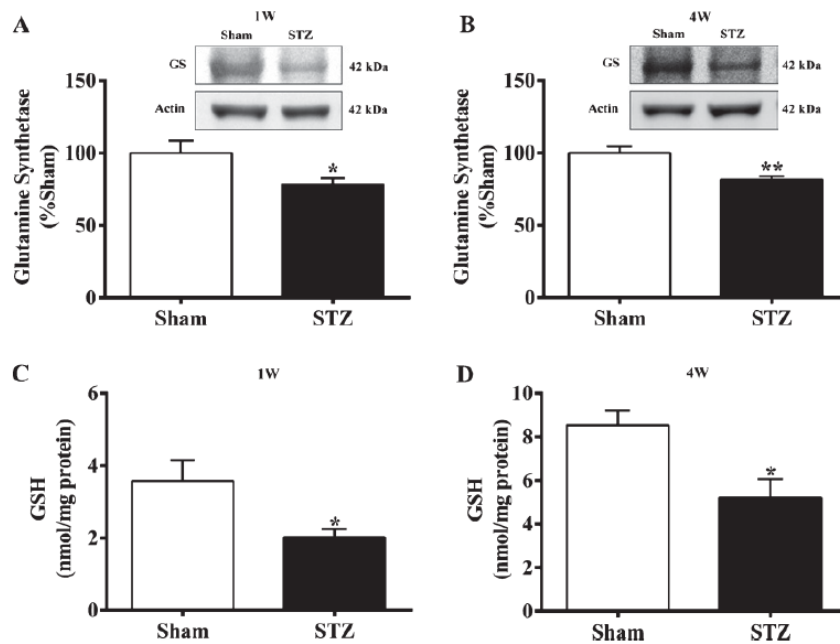


Fig. 6. Glutamine synthetase immunocontent and reduced content of glutathione in ICV STZ models of AD. Glutamine synthetase (GS) content was determined by western blotting; reduced glutathione (GSH) content was measured by fluorescence in the presence of o-phthalaldehyde (and expressed as nmol of GSH/mg protein). Changes in GS content, at 1 and 4 weeks, are shown in A and B, respectively. C and D show changes in GSH contents. Values are mean \pm standard error of 9 rats in each group. * Significant differences from the sham group by Student's *t* test, $p < 0.05$.

cognition and cortical brain tissues present extensive neuronal loss and gliosis, in addition to two classic lesions; the accumulation of A β peptide and

hyperphosphorylation of the tau protein, forming neurofibrillary tangles. ICV STZ administration has been used as an appropriate model for sporadic AD,

as it shares several biochemical alterations with the disease, including insulin resistance, A β deposition and tau phosphorylation [10, 26]. Moreover, ICV STZ administration has been used to accelerate and exacerbate signals in a transgenic model of AD.

The ICV STZ mechanism of damage to brain cells is unknown, but in the pancreas, it depends on the glucose transporter type 2 (Glut2). In the brain tissue, this transporter appears to be restricted to some hypothalamic neurons and parasynaptic astrocytes [27]. Neuronal damage may explain body weight changes in these animals; however, feeding behavior was not evaluated in these animals.

There is an evident association between protein hypo-O-GlcNAcylation and AD, but the mechanistic connections remain unclear. Several pathways have been proposed to explain the low levels of O-GlcNAc in the brain tissue of AD patients and models (see Fig. 7). About 2-3% of incoming glucose is physiologically shifted to UDP-GlcNAc synthesis, the OGT substrate for O-GlcNAc protein modification [28]. Therefore, the first possible mechanism may be that a reduced glucose flux led to reduced levels of UDP-GlcNAc and consequently to reduced levels of O-GlcNAcylated proteins. In fact, inhibition of UDP-GlcNAc synthesis led to decreased protein O-GlcNAcylation [6, 14].

Another proposed mechanism involves NO as a mediator. A β peptide exposure of neuroblastoma cells led to NO synthesis and then nitrosylation of OGT, which, in turn, reduces OGT activity [29]. Moreover, it is important to mention that a reduced glucose flux or increased NO synthesis, could be accompanied by decreased levels of GSH due to reduced recycling (dependent on glucose for NADPH synthesis) or consumption (as a consequence of NO quenching), respectively. Consistent with this hypothesis, decreased levels of GSH are found in AD and in the STZ-induced model of dementia [17, 30]. Herein, we propose a third possible mechanism to explain decreased O-GlcNAc in ICV STZ-treated rats, namely due to a decrease in hippocampal OGT content. This decrease may explain the reduced levels of protein O-GlcNAcylation in the model. Accordingly, a decrease in hepatic OGT in STZ-induced diabetic rats has been reported [31]. On the other hand, specific increments in protein O-GlcNAcylation and mislocation of OGT have been found in the diabetic heart of rats [13]. Lower levels of protein O-GlcNAc modification have been reported in the STZ model of AD in the cerebrum of rats, but not in the cerebellum [14]. In another study in mice,

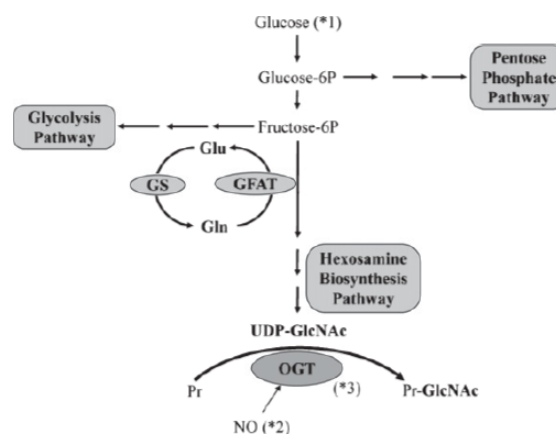


Fig. 7. Schematic representation of pathways related to protein O-GlcNAcylation. Glucose 6-phosphate is involved in three pathways: glycolysis itself (on left), pentose phosphate pathway (PPP), as a source of NADPH (right) and in the hexosamine pathway (down), as a source of UDP-GlcNAc. This compound leads to O-GlcNAc modification of proteins by OGT catalysis. Asterisks indicate three possible mechanisms involved in the hypo-GlcNAcylation observed in AD: *1 (due to glucose hypometabolism); *2 (due to nitrosylation of OGT, mediated by NO) and *3 (due to decreased OGT, as proposed in this study). GFAT, glutamine-fructose-6-phosphate-transaminase; GS, glutamine synthetase; Glu, glutamate; Gln, glutamine; Pr, protein.

using this model of sporadic AD, mRNA levels of OGT and OGA, the enzyme that removes GlcNAc from proteins, were not altered [15]. It is important to mention that OGA has been less than OGT studied in AD [32].

There is much evidence to suggest that insulin resistance in the brain might be the primary event in AD [33], and brain insulin resistance is relatively well characterized in the ICV STZ model of AD [34]. Phosphorylation at Ser 307 of IRS-1 is the basis of the insulin resistance observed in inflammatory and metabolic disorders. Consistent with this, we found an increment of IRS-1 at Ser 307 in the ICV STZ model of AD. Notably, the OGT decrease precedes IRS-1 phosphorylation. However, the mechanism involved in Ser 307 phosphorylation is unclear at moment, and the connection between OGT and insulin resistance is a matter of debate [9]. Ser/Thr residues of IRS-1 are O-GlcNAc-modified, which may affect the phosphorylation status of the protein [35]. It is not known whether Ser 307 of IRS-1, specifically, is a direct target of OGT, but it is possible to conceive that reduced levels of OGT may lead to a decrease in the O-GlcNAc-modification of IRS-1, which could favor phosphorylation at determined site(s), in turn, favoring Ser-307 phosphorylation,

recognized as a site related to insulin resistance. However, this issue deserves further experimental investigation. It is noteworthy that the RL2 antibody predominantly recognized bands of lower than 65 kDa in hippocampal tissue, in contrast to observations in the whole brain tissue samples reported by Liu's work [36], possibly due to methodological differences.

We found a reduced hippocampal glucose uptake in ICV STZ-treated rats at four weeks, in association with the insulin resistance and spatial cognitive deficit observed in these animals. This is in agreement with reduced levels of the glucose transporter subtypes 1 and 3 reported in this model at 3 weeks after STZ [14]. However, we observed a decrease in protein O-GlcNAc modification at one and four weeks in STZ-treated rats. Accordingly, glucose metabolism impairment and reduced protein O-GlcNAcylation modified are observed in AD [6]. Glucose hypometabolism in AD is interpreted as a reduction in neuronal glucose consumption, but it is not possible to ignore concomitant changes in glucose flow through astrocytes, as these cells also use glucose for synthesis of substrates for neuronal metabolism such as glutamine, glutathione and cholesterol, in addition to energetic requirements. Astrocytes exhibit a higher expression and activity of glyoxalase enzymes, responsible for the detoxification of methylglyoxal (MG), a glycolytic subproduct that is increased during a higher glucose flux [37]. We also observed an increase in GLO-1 in ICV STZ-treated animals at four weeks, suggesting that this glucose uptake impairment does not uniformly affect all brain cells and that some cells, possibly astrocytes, are submitted to an increased glucose flux.

Although it seems probable that glucose hypometabolism can lead to decreased protein O-GlcNAcylation, it is possible that a cross-talk may occur, in which glucose transporters and/or glycolytic enzymes in the brain tissue are affected by O-GlcNAcylation changes, causing the decrease in glucose metabolism. In support of this hypothesis, O-GlcNAc modification affects GAPDH in the glycolytic pathway [38] and glucose transporter 4 [39]. However, in peripheral tissues, O-GlcNAc has been proposed to act as a nutrient sensor when glucose is offered to limit glucose metabolism.

The involvement of astrocytes is confirmed once more in the ICV STZ model of AD by changes in GFAP and S100B. Notably, in the brain tissue of AD patients, in addition to A β deposition and neurofibrillary tangles, gliosis is always present next to plaques

and degenerative neurons. Transgenic animal models of AD that overexpress A β PP show signs of gliosis, but also sign of atrophy in astrocytes far from amyloid deposition [40]. We, herein, describe early and persistent sign of gliosis, based on GFAP immuncontent. Notice that at this time (1 or 4 weeks), no signs of A β deposition were observed in this model (data not shown). In fact, A β deposition is a long-term finding in the ICV STZ model of AD [41]. Therefore, gliosis precedes A β deposition in this model and this is in agreement with the current view that astroglial alterations appear before classic neuronal alterations [3]. S100B is another marker of tissue astroglial gliosis, but in contrast to GFAP, we observed an increase only at 4 weeks and a decrease at 1 week. These data reinforce the idea of the heterogeneity of glial cells and/or of the glial response. Other studies have reported different changes (in time, intensity or directions) in these proteins under conditions of injury (e.g., [42]). Regardless of the different profiles of changes at one week, both proteins reinforce the idea of hippocampal astroglial gliosis in the ICV STZ model of AD.

In contrast to GFAP, which is a cytoskeletal protein, S100B is soluble and a small fraction is secreted by astrocytes. *In vitro* studies suggest extracellular trophic or apoptotic effects of S100B, depending on its concentration, on neighboring cells [43]. More recently, this protein has been suggested to act as an alarmin (e.g., [44]). Nevertheless, extracellular changes in the levels of this protein (in the CSF, serum, or extracellular medium of *in vitro* preparations) have been interpreted as signs of astroglial activation, both *in vivo* and *in vitro* [45]. An increment of CSF S100B was reported in patients with mild cognitive deficit, but not in the dementia phase of AD [46]. However, a decrease in the CSF content of S100B has been described in the ICV STZ model of AD [16] and other dementia models, such as chronic cerebral hypoperfusion [47] and ICV okadaic acid administration [23]. Herein, we confirmed a later decrease in CSF S100B, at 4 weeks after STZ administration; however, for the first time, we observed an earlier increase at one week post-administration, likely related to the acute injury induced by STZ, as described in other acute brain injury conditions (e.g., [48, 49]).

Interestingly, CSF S100B levels also drop during ketogenic conditions [50, 51] and brain protein O-GlcNAc levels are lower during fasting [52]. Therefore, when brain glucose utilization is reduced, both brain O-GlcNAc levels and CSF S100B decline;

however, the relationship between these events, if it exists, is far from clear. We recently reported that insulin modulates S100B secretion in acute hippocampal slices and it is possible that the decrease in the ICV STZ model of AD is related to insulin resistance [53].

Changes in specific astroglial markers do not necessarily reflect any dysfunction in these cells. As such, we investigated two brain markers, which are directly dependent on astrocyte – glutamine synthetase and the content of reduced glutathione. The ICV STZ model of AD displayed alterations in both of these markers, at one and four weeks after STZ administration.

In the brain, astrocytes predominantly express GS and are, therefore, able to synthesize glutamine, the amine source for glutamine-fructose-6-phosphate-transaminase (GFAT), a key regulator enzyme in the hexosamine pathway of UDP-GlcNAc synthesis (Fig. 7). A decrease in GS activity has been proposed in AD genesis [54]; corroborating this, GS activity is decreased in the STZ model of dementia [17]. In addition, a recent meta-analysis of genomic data suggests that GS may represent the link between AD and diabetes mellitus [55]. Our data indicate that this decrease in GS activity is an early alteration in ICV STZ models of AD.

The hippocampal GSH content is also reduced during the first week after ICV STZ administration. Deficient GSH synthesis and recycling in astrocytes, as well as glutathione trafficking between astrocytes and neurons, make neuronal cells particularly susceptible to damage and death [56, 57]. We have shown a decrease in GSH in the ICV STZ model of dementia [18] and present data to indicate the time point at which this occurs.

It is not known whether GS or antioxidant enzymes dependent on GSH are affected by changes in O-GlcNAc levels, but this possibility cannot be ruled out and a cross-talk does seem to exist. Ammonia exposure induces reversible protein O-GlcNAcylation in astrocyte cultures in a GS-dependent manner [38]. Moreover, glutathione depletion by diethyl maleate appears to increase OGT expression and O-GlcNAc protein modification in the rat skeletal muscle [58]. These findings indicate that glutamine synthesis affects GFAT, the regulator enzyme of the hexosamine pathway and that the oxidative environment promotes protein O-GlcNAc modification.

STZ is an analog compound of GlcNAc and therefore could, *per se*, affect protein O-GlcNAc

modification [11]. In fact, STZ acts as an inhibitor of OGA, promoting augmented O-GlcNAc protein modification [12, 59]. However, in the diabetic models induced by STZ, a general decrease in O-GlcNAcylation is observed as a long-term consequence of this compound. Similarly, STZ releases NO, and OGT nitrosylation could reduce its activity, but there is no evidence that NO is long-term mediator of STZ.

In summary, we identified an early (at one week) and persistent (at four weeks) decrease in OGT protein levels in the ICV STZ model of sporadic AD, as characterized by the spatial cognitive deficit in the Morris water maze. We found increased phosphorylation at Ser 307 of IRS-1, a molecular sign of resistance in the insulin signaling. IRS-1 is a target of OGT and increased phosphorylation at this site, which can explain the brain insulin resistance in these animals. However, further experiments will be necessary to identify specific changes in O-GlcNAc levels in targets of OGT. The decrease in OGT and consequent protein O-GlcNAc modifications appear to precede the decrease in glucose uptake and increment of glyoxalase system observed in the hippocampus. The astroglial reactivity in this model was confirmed by hippocampal changes in GFAP and S100B, as well as alterations in CSF S100B. Moreover, decreases in hippocampal glutamine synthetase and GSH content suggest astroglial dysfunction, which is possibly involved in the cognitive decline and neurodegenerative cascade triggered in this model. Together, these data contribute to understanding the biochemical changes and astrocyte dysfunction in the ICV STZ model of AD, and may help to explain cognitive and metabolic alterations (particularly the decrease in protein O-GlcNAc levels and insulin resistance) observed in AD.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Ministry of Education (MEC/CAPES, Brazil), State Foundation for Scientific Research of Rio Grande do Sul (FAPERGS), and National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection (MCT/INCTEN).

Authors' disclosures available online (<http://j-alz.com/manuscript-disclosures/17-0211r3>).

REFERENCES

- [1] Medeiros R, Chabrier MA, LaFerla FM (2013) Elucidating the triggers, progression, and effects of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **33**(Suppl 1), S195-210.
- [2] Zetterberg H, Mattsson N (2014) Understanding the cause of sporadic Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* **14**, 621-630.
- [3] Leclerc B, Abulrob A (2013) Perspectives in molecular imaging using staging biomarkers and immunotherapies in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* **2013**, 589308.
- [4] Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW (1992) Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* **267**, 9005-9013.
- [5] Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW (1997) Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* **272**, 9308-9315.
- [6] Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2009) Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* **132**, 1820-1832.
- [7] Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX (2004) O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 10804-10809.
- [8] Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: Roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* **80**, 825-858.
- [9] Yuzwa SA, Vocadlo DJ (2014) O-GlcNAc and neurodegeneration: Biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond. *Chem Soc Rev* **43**, 6839-6858.
- [10] Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P (2013) What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm (Vienna)* **120**, 233-252.
- [11] Roos MD, Xie W, Su K, Clark JA, Yang X, Chin E, Paterson AJ, Kudlow JE (1998) Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Proc Assoc Am Physicians* **110**, 422-432.
- [12] Akimoto Y, Kreppel LK, Hirano H, Hart GW (2000) Increased O-GlcNAc transferase in pancreas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* **43**, 1239-1247.
- [13] Ramirez-Correa GA, Ma J, Slawson C, Zeidan Q, Lugo-Fagundo NS, Xu M, Shen X, Gao WD, Caceres V, Chakir K, DeVine L, Cole RN, Marchionni L, Paolucci N, Hart GW, Murphy AM (2015) Removal of abnormal myofilament O-GlcNAcylation restores Ca²⁺ sensitivity in diabetic cardiac muscle. *Diabetes* **64**, 3573-3587.
- [14] Deng Y, Li B, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (2009) Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **175**, 2089-2098.
- [15] Chen Y, Tian Z, Liang Z, Sun S, Dai CL, Lee MH, LaFerla FM, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong CX (2012) Brain gene expression of a sporadic (icv-STZ Mouse) and a familial mouse model (3xTg-AD mouse) of Alzheimer's disease. *PLoS One* **7**, e51432.
- [16] Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, Quilfeldt JA, Achaval M, Goncalves CA (2009) Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis* **17**, 193-202.
- [17] Tramontina AC, Wartchow KM, Rodrigues L, Biasibetti R, Quincozes-Santos A, Bobermin L, Tramontina F, Goncalves CA (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**, 1641-1649.
- [18] Biasibetti R, Tramontina AC, Costa AP, Dutra MF, Quincozes-Santos A, Nardin P, Bernardi CL, Wartchow KM, Lunardi PS, Goncalves CA (2013) Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behav Brain Res* **236**, 186-193.
- [19] Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**, 47-60.
- [20] Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-356.
- [21] Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* **169**, 93-99.
- [22] Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andrezza AC, Gottfried C, Kapczynski F, Goncalves CA (2007) Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* **162**, 282-286.
- [23] Broetto N, Hansen F, Brolese G, Batassini C, Lirio F, Galland F, Dos Santos JP, Dutra MF, Goncalves CA (2016) Intracerebroventricular administration of okadaic acid induces hippocampal glucose uptake dysfunction and tau phosphorylation. *Brain Res Bull* **124**, 136-143.
- [24] Hansen F, Pandolfo P, Galland F, Torres FV, Dutra MF, Batassini C, Guerra MC, Leite MC, Goncalves CA (2016) Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. *Physiol Behav* **164**, 93-101.
- [25] Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* **108**, 347-352.
- [26] Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai CL, Sun S, Lee MH, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong CX (2013) A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: Similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol Neurobiol* **47**, 711-725.
- [27] Nardin P, Tramontina AC, Sesterheim P, Rodrigues L, Biasibetti R, Goncalves CA (2014) Cognitive impairment induced by streptozotocin: an experimental link between diabetes and Alzheimer's disease. In *Streptozotocin: Uses, mechanism of action and side effects*, Gauthier EL, ed. New Developments in Medical Research, United States.
- [28] Marshall S, Bacote V, Traxinger RR (1991) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* **266**, 4706-4712.

- [29] Ryu IH, Lee KY, Do SI (2016) Abeta-affected pathogenic induction of S-nitrosylation of OGT and identification of Cys-NO linkage triplet. *Biochim Biophys Acta* **1864**, 609-621.
- [30] Ishrat T, Parveen K, Hoda MN, Khan MB, Yousof S, Ansari MA, Saleem S, Islam F (2009) Effects of Pycnogenol and vitamin E on cognitive deficits and oxidative damage induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Behav Pharmacol* **20**, 567-575.
- [31] Majumdar G, Wright J, Markowitz P, Martinez-Hernandez A, Raghov R, Solomon SS (2004) Insulin stimulates and diabetes inhibits O-linked N-acetylglucosamine transferase and O-glycosylation of Sp1. *Diabetes* **53**, 3184-3192.
- [32] Forster S, Welleford AS, Triplett JC, Sultana R, Schmitz B, Butterfield DA (2014) Increased O-GlcNAc levels correlate with decreased O-GlcNAcase levels in Alzheimer disease brain. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 1333-1339.
- [33] Bedse G, Di Domenico F, Serviddio G, Cassano T (2015) Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: Current knowledge. *Front Neurosci* **9**, 204.
- [34] Salkovic-Petrisic M, Hoyer S (2007) Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: An experimental approach. *J Neural Transm Suppl* **217**-233.
- [35] Klein AL, Berkaw MN, Buse MG, Ball LE (2009) O-linked N-acetylglucosamine modification of insulin receptor substrate-1 occurs in close proximity to multiple SH2 domain binding motifs. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2733-2745.
- [36] Liu Y, Li X, Yu Y, Shi J, Liang Z, Run X, Li Y, Dai CL, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong CX (2012) Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS One* **7**, e43724.
- [37] Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ (2015) Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front Neurosci* **9**, 23.
- [38] Karababa A, Gorg B, Schliess F, Haussinger D (2014) O-GlcNAcylation as a novel ammonia-induced posttranslational protein modification in cultured rat astrocytes. *Metab Brain Dis* **29**, 975-982.
- [39] Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Hresko RC, Mueckler MM (2002) Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E241-250.
- [40] Rodriguez JJ, Witton J, Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A (2010) Increase in the density of resting microglia precedes neuritic plaque formation and microglial activation in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis* **1**, e1.
- [41] Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, Salkovic-Petrisic M (2015) Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* **122**, 577-592.
- [42] Vicente E, Boer M, Leite M, Silva M, Tramontina F, Porciuncula L, Dalmaz C, Goncalves CA (2004) Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats. *Neurotoxicology* **25**, 771-777.
- [43] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1008-1022.
- [44] Xu J, Wang H, Won SJ, Basu J, Kapfhamer D, Swanson RA (2016) Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Glia* **64**, 1869-1878.
- [45] Goncalves CA, Leite MC, Nardin P (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* **41**, 755-763.
- [46] Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **39**, 409-413.
- [47] Vicente E, Degerone D, Bohn L, Scornavaca F, Pimentel A, Leite MC, Swarowsky A, Rodrigues L, Nardin P, de Almeida LM, Gottfried C, Souza DO, Netto CA, Goncalves CA (2009) Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* **1251**, 204-212.
- [48] Kleindienst A, Hesse F, Bullock MR, Buchfelder M (2007) The neurotrophic protein S100B: Value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog Brain Res* **161**, 317-325.
- [49] Batassini C, Broetto N, Tortorelli LS, Borsoi M, Zanotto C, Galland F, Souza TM, Leite MC, Goncalves CA (2015) Striatal injury with 6-OHDA transiently increases cerebrospinal GFAP and S100B. *Neural Plast* **2015**, 387028.
- [50] Ziegler DR, Oliveira DL, Pires C, Ribeiro L, Leite M, Mendez A, Goncalves D, Tramontina F, Portela LV, Wofchuk ST, Perry ML, Goncalves CA (2004) Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res* **50**, 375-379.
- [51] Vizuete AF, de Souza DF, Guerra MC, Batassini C, Dutra MF, Bernardi C, Costa AP, Goncalves CA (2013) Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. *Life Sci* **92**, 923-928.
- [52] Li X, Lu F, Wang JZ, Gong CX (2006) Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. *Eur J Neurosci* **23**, 2078-2086.
- [53] Warchow KM, Tramontina AC, de Souza DF, Biasibetti R, Bobermin LD, Goncalves CA (2016) Insulin stimulates S100B secretion and these proteins antagonistically modulate brain glucose metabolism. *Neurochem Res* **41**, 1420-1429.
- [54] Butterfield DA (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res* **36**, 1307-1313.
- [55] Mirza Z, Ali A, Ashraf GM, Kamal MA, Abuzenadah AM, Choudhary AG, Damanhour GA, Sheikh IA (2014) Proteomics approaches to understand linkage between Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **13**, 213-225.
- [56] Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* **62**, 649-671.
- [57] Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolanos JP (2012) Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J* **443**, 3-11.
- [58] Petemelj TT, Marsh SA, Strobel NA, Matsumoto A, Briskey D, Dalbo VJ, Tucker PS, Coombes JS (2015) Glutathione depletion and acute exercise increase O-GlcNAc protein modification in rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* **400**, 265-275.
- [59] Toleman C, Paterson AJ, Shin R, Kudlow JE (2006) Streptozotocin inhibits O-GlcNAcase via the production of a transition state analog. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 526-534.

Parte III

Discussão

1. Modificações Precoces e Persistentes da Proteína O-GlcNAc no Modelo de STZ ICV

Este estudo procurou caracterizar as perdas cognitivas, o hipometabolismo da glicose, a participação astrocitária e as alterações características da infusão ICV de STZ, um modelo da DA esporádico. Visto a sinalização da insulina no cérebro desempenhar um papel fundamental no SNC (BANKS *et al.*, 2012), a redução do metabolismo da glicose e a resistência à insulina no cérebro são considerados os principais fatores envolvidos na DA esporádica (GUO *et al.*, 2017). Além disso, esta tese demonstrou que a glia tem participação direta nos efeitos neurotóxicos observados no modelo de STZ-ICV.

Os animais infundidos com STZ demonstraram uma deficiência clara na memória espacial no labirinto aquático de Morris após quarta semana de administração, resultado caracterizado pelo declínio progressivo da cognição e relacionado às funções dependentes do hipocampo, como aprendizagem espacial e a memória (MAYER *et al.*, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2009; TRAMONTINA *et al.*, 2011; BASSANI *et al.*, 2017). Essa disfunção cognitiva em consequência da infusão da STZ é um marcador crítico, visto que a desorientação e as deficiências da memória espacial são características primárias do declínio progressivo em pacientes com DA (GRUNBLATT *et al.*, 2007). Como observado após 4 semanas nesse trabalho, a deficiência no aprendizado e na memória de ratos tratados com STZ-ICV foi evidenciado em diversos tempos após a injeção, de 24 horas a 3 meses após a infusão (GRUNBLATT *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2014; RAJASEKAR *et al.*, 2017), indicando um dano inicial e progressivo nos mecanismos de formação e estruturação dessas funções cerebrais. Além disso, observamos uma diferença nos pesos dos animais de ambos os grupos no pós-operatório, com perda maior no grupo STZ, como sugerido em trabalhos anteriores (PATHAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2014). Essa perda possivelmente estaria associada ao envolvimento do hipocampo na interpretação de sinais de fome, visto que lesões específicas com ácido ibotênico prejudicam a habilidade sensorial interoceptivas da privação de alimentos e saciedade (DAVIDSON E JARRARD, 1993; PATHAN *et al.*, 2006).

A sinalização da insulina e a demanda de glicose do cérebro tornou-se ponto central na pesquisa da DA, visto que o início do tipo tardio da doença está associado a anormalidades na utilização da glicose pelo córtex cerebral e por estruturas que apresentam alta taxa de consumo e sensibilidade à insulina (HENNEBERG E HOYER, 1995). Embora o cérebro seja extremamente vulnerável à variação na sinalização da insulina e no metabolismo da glicose, acreditava-se na independência do cérebro à insulina (PARK E JOHNSON, 1955), até a detecção

ubíqua dos receptores de insulina no cérebro de roedores e humanos, combinado com as evidências da travessia da insulina pela BHE por saturação mediado por receptor (SCHIOTH *et al.*, 2012). A utilização da STZ, uma substância seletivamente tóxica para células β pancreáticas, que induz *diabetes mellitus* experimental em ratos após a administração periférica e em altas doses (SZKUDELSKI, 2001), ao ser infundida no SNC em doses subdiabetogênicas a STZ modifica o metabolismo da glicose sem alterar a glicemia sanguínea e produzir *diabetes mellitus* (NITSCH E HOYER, 1991; PLASCHKE E HOYER, 1993).

Embora o comprometimento cognitivo e a demência sejam amplamente relatados na diabetes, outros diferentes fatores têm sido sugeridos, como a sinalização prejudicada pela insulina, resistência à insulina, estresse oxidativo, episódios hiperglicêmicos ou hipoglicêmicos e toxicidade de glicose (BIESSELS *et al.*, 2005; BORNSTEIN *et al.*, 2014). A O-GlcNAcilação é considerado um sensor do metabolismo da glicose intracelular, assim níveis reduzidos de glicose intracelular resulta em diminuição da O-GlcNAcilação, já que o doador, a UDP-GlcNAc, é sintetizado nas células a partir do metabolismo da glicose através da via biossintética da hexosamina (CHATHAM *et al.*, 2008). Assim, existe uma associação evidente entre a hipo-O-GlcNAcilação da proteína e a DA, mas com conexões mecanicistas obscuras.

Em condições fisiológicas uma pequena parcela da glicose absorvida é deslocada para a síntese UDP-GlcNAc, o substrato OGT para a modificação da proteína O-GlcNAc (MARSHALL *et al.*, 1991). Os mecanismos que conduzem as alterações transitórias na O-GlcNAcilação parece diferenciar entre os diferentes tipos de células e/ou condições. Portanto, a redução no fluxo de glicose pode afetar diretamente os níveis de UDP-GlcNAc, resultando consequentemente em baixos níveis de proteínas O-GlcNAcyladas, como resposta a inibição da síntese de UDP-GlcNAc (DENG *et al.*, 2009; LIU, F. *et al.*, 2009). O NO, como mediador, altera os níveis de O-GlcNAcilação em células expostas ao peptídeo A β , aumentando a síntese do próprio NO e, consequentemente, o estado de nitrosilação da OGT, reduzindo a atividade enzimática (RYU *et al.*, 2016). Conjuntamente a essa mudanças é observado níveis diminuídos de glutathiona reduzida (GSH) por redução no processo de reciclagem ou ao consumo, corroborando com os níveis encontrados na DA e no modelo de demência induzidos por STZ (ISHRAT *et al.*, 2009; TRAMONTINA *et al.*, 2011).

Acreditamos que a redução do imunoconteúdo da OGT no hipocampo dos animais tratados com STZ ICV segue mecanismos semelhantes a aqueles encontrados no fígado de ratos diabéticos induzidos por STZ (ISHRAT *et al.*, 2009). Embora, modificações específicas em proteínas O-GlcNAcyladas e localização alteradas da OGT tenham sido encontradas no

tecido cardíaco de ratos diabéticos (RAMIREZ-CORREA *et al.*, 2015). Entretanto, níveis reduzidos de proteínas O-GlcNAcizadas também foram encontrados no cérebro de animais submetidos ao modelo de DA utilizando STZ ICV (DENG *et al.*, 2009). Corroborando nossos resultados, mudanças no mRNA das enzimas OGT e OGA, foram encontrados em modelos animais de DA esporádico, mas sem alteração dos níveis da enzima que remove a GlcNAc de proteínas (CHEN *et al.*, 2012).

Avaliamos o mecanismo de resistência à insulina no hipocampo pela fosforilação da Ser 307 do IRS1, um marcador bem aceito como base da resistência à insulina em distúrbios inflamatórios e metabólicos, visto ser evidenciado como principal evento na DA e ser relativamente bem caracterizado no modelo de STZ ICV (SALKOVIC-PETRISIC E HOYER, 2007; BEDSE *et al.*, 2015). Ao avaliarmos esse parâmetro, encontramos um aumento na fosforilação da Ser 307 do IRS1 no modelo da STZ ICV, seguido por uma redução clara no conteúdo da OGT precedendo a fosforilação da IRS1. Entretanto, não é possível afirmar o real mecanismo de fosforilação, já que a ligação entre a OGT e a resistência à insulina ainda são bastante questionados (YUZWA E VOCADLO, 2014). Sabe-se que a OGT é responsável pela adição catalítica da porção GlcNAc e, por meio de uma ligação O- β -glicosídica, a resíduos de serina e treonina em proteínas-alvo (HAN *et al.*, 2017). Embora não seja relatado se a Ser307 do IRS1 é um alvo direto da OGT, mas acreditamos que os níveis reduzidos da enzima afetariam a modificação de O-GlcNAc do IRS1, favorecendo a fosforilação de sítios específicos que resultaria na fosforilação da Ser307, sítio reconhecido por sua relação com a resistência à insulina (KLEIN *et al.*, 2009).

A manutenção dos níveis de glicose é um fator importante na fisiologia do cérebro e como estimulador na formação da memória (MESSIER, 2004; PASQUIER *et al.*, 2006). Entretanto, variações drásticas nos níveis fisiológicos de glicose foram associados a disfunções cognitivas em pacientes com diabetes tipo 1 ou 2 (KAWAMURA *et al.*, 2012). Na nossa avaliação encontramos uma redução na captação de glicose no hipocampo dos animais tratados com STZ ICV após a quarta semana, associado com a resistência à insulina e o déficit cognitivo espacial. Nossos resultados estão de acordo com os níveis reduzidos dos GLUT 1 e 3 encontrados no modelo após a infusão da STZ (DENG *et al.*, 2009), embora tenhamos observado a diminuição nas modificações por O-GlcNAcilação nas proteínas totais a partir da primeira semana. Por conseguinte, esse comprometimento do metabolismo da glicose e a redução da O-GlcNAcilação nas proteínas são observados na DA (LIU, F. *et al.*, 2009).

O hipometabolismo da glicose nas diferentes regiões do cérebro ocorrem de forma diferenciada entre os relacionados ao envelhecimento e os padrões metabólicos típicos da DA e outras demências (BERTI *et al.*, 2014). Na DA o hipometabolismo está associado a redução no consumo de glicose neuronal, além de alterações na estrutura funcional da BHE e no fluxo da glicose através dos astrócitos. Visto que, os astrócitos são as células responsáveis pela utilização da glicose na síntese de substratos metabólicos para o neurônio, como glutamina, GSH, colesterol e fonte energética. Além disso, exibem uma alta expressão e atividade de enzimas desintoxicantes como a glioxalase, responsável pela desintoxicação do metilglioxal, um subproduto glicolítico extremamente reativo e aumentando durante um maior fluxo de glicose intracelular (ALLAMAN *et al.*, 2015). Neste contexto, encontramos um aumento na enzima glioxalase 1 no grupo de animais tratados com STZ ICV após quatro semanas, sugerindo um comprometimento da absorção e do fluxo da glicose diferenciado entre os diversos tipos celulares que compõe o tecido, e possivelmente os astrócitos são submetidos a um aumento compensatório do fluxo de glicose.

É amplamente relatado o papel crítico dos astrócitos nos processos fisiológicos do SNC, incluindo a homeostase do glutamato, fluxo sanguíneo cerebral, excitabilidade e suporte metabólico dos neurônios, além do desenvolvimento e plasticidade sináptica. Entretanto, os astrócitos contribuem contraditoriamente com a progressão de lesões no SNC e doenças neurodegenerativas como a DA (JALBERT *et al.*, 2008). Confirmamos o envolvimento dos astrócitos no modelo de STZ ICV pelas mudanças nos níveis das proteínas GFAP e S100B, já que o tecido cerebral de pacientes com DA, além da deposição de A β e emaranhados neurofibrilares, apresentam extensiva gliose reativa. Os modelos transgênicos da DA com superexpressão da proteína APP mostram sinais evidentes de gliose localizada, mas com atrofia astrocitária distante da deposição amilóide (RODRIGUEZ *et al.*, 2010). Encontramos sinais de gliose em ambos os períodos analisados, avaliados pelo imunoconteúdo da proteína GFAP, mesmo na ausência de sinais de deposição de A β . Como característica desse modelo de DA a deposição de A β ocorre após um longo prazo de exposição a STZ (KNEZOVIC *et al.*, 2015), sugerindo que a gliose antecede a deposição amilóide no modelo e colaborando com a visão atual que alterações astrogliais ocorrem antes das alterações neuronais clássicas (LECLERC E ABULROB, 2013).

As células astrocitárias que compõem o SNC expressam um conjunto variado de proteínas marcadoras fenotípicas, sendo o mais utilizado a GFAP, embora alguns astrócitos expressem pouca ou nenhuma GFAP (SOFRONIEW E VINTERS, 2010), exigindo que outros

marcadores sejam utilizados. Por ser outro marcador de astrogliose tecidual, utilizamos a proteína S100B como parâmetro astrogial, observamos um aumento somente após 4 semanas em contraste a GFAP, enquanto na primeira semana encontramos uma diminuição. Nossos achados reforçam a ideia de heterogeneidade das células gliais e/ou suas respostas frente a diferentes mudanças no ambiente celular. Embora bem aceitas como marcadores astrocitários, a GFAP por ser uma proteína citoesquelética e a S100B é solúvel, pequenas frações da S100B podem ser secretada pelos astrócitos, atuando extracelularmente como fatores tróficos ou apoptóticos, conforme sua concentração, em células vizinhas (DONATO *et al.*, 2009).

O aumento dos níveis de S100B no líquido cefalorraquidiano (LCR) foi observado em paciente com déficit cognitivo leve, semelhante ao resultado após 1 semana de exposição a STZ, mas o aumento não foi encontrado na fase de demência da DA (PESKIND *et al.*, 2001). Entretanto, a redução no conteúdo de S100B no LCR foi relatado em diversos modelos de demência, como da STZ ICV (RODRIGUES *et al.*, 2009), hipoperfusão cerebral crônica (VICENTE *et al.*, 2009), a administração ICV de ácido ocadáico (BROETTO *et al.*, 2016) e confirmamos a diminuição da S100B no LCR após quatro semanas da infusão de STZ. Ainda, demonstramos um aumento nos níveis da proteína uma semana após a administração, provavelmente pela lesão aguda induzida pela STZ, como descrito em lesões cerebrais agudas (KLEINDIENST *et al.*, 2007; BATASSINI *et al.*, 2015).

Investigamos a participação de outros marcadores cerebrais, diretamente dependentes dos astrócitos, a glutamina sintetase (GS) e o conteúdo de GSH. Nossos resultados demonstraram que as alterações nestes marcadores ocorreram em ambos os períodos analisados. No cérebro, os astrócitos expressam predominantemente a GS, enzima responsável pela síntese da glutamina, substrato utilizado pela enzima glutamina:frutose-6-fosfato transaminase (GFAT) na síntese da glicosamina-6-fosfato e regulador chave na síntese da UDP-GlcNAc. A diminuição na atividade da GS foi relatada tanto na gênese da DA (BUTTERFIELD, 2002) como no modelo de STZ ICV (TRAMONTINA *et al.*, 2011). Corroborando com isso, dados genômicos sugerem que a GS representa um vínculo importante entre a DA e o *diabetes mellitus* (MIRZA *et al.*, 2014). Ademais, nossos dados indicam que essa redução na GS é uma alteração precoce no modelo da STZ ICV. A avaliação dos índices de GSH nos hipocampus mostrou-se reduzido precocemente após a administração da STZ, provavelmente por alterações na síntese, reciclagem astrocitária e no tráfego de GSH entre os astrócitos e os neurônios, aumentando a susceptibilidade das células neuronais a danos e a morte (DRINGEN, 2000; FERNANDEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2012).

Conclusão

Nessa tese podemos concluir que a infusão da STZ ICV contribui para as disfunções celulares e cognitivas dos animais submetidos ao modelo. Encontramos uma deficiência na recuperação do peso dos animais, possivelmente relacionado aos mecanismos de controle do apetite. Já o déficit cognitivo sugere uma disfunção nos mecanismos neuronais de aquisição e retenção da memória, dependentes principalmente do funcionamento adequado do hipocampo. Ainda, acreditamos que a redução nos níveis da enzima OGT estejam impactando diretamente na redução das proteínas modificadas por O-GlcNAc, que presumimos está relacionado a ação doadora de NO realizado pela STZ que pode provocar a nitrosilação da OGT, resultando em redução da atividade enzimática. Conjuntamente, os níveis elevados da serina 307 fosforilada do IRS-1 é um indicativo claro da ocorrência de disfunções na sinalização da insulina, que impacta diretamente na absorção de glicose e induz mudanças metabólicas graves no hipocampo.

Nossos resultados sugerem que as mudanças metabólicas induzidas pela STZ ICV estimula a ativação glial, tornando sua resposta exacerbada e disfuncional como observadas no modelo animal. Encontramos uma ativação simultânea do NF κ B e da enzima COX-2, configurando uma ativação precoce na sinalização inflamatória, acompanhada da ativação persistente de astrócitos e microglia, bem como da proteólise da enzima calcineurina. Embora sejam necessários avaliações adicionais para caracterizar o papel da proteólise da calcineurina no modelo de STZ ICV, acreditamos que a sinalização inflamatória induzida pela isoforma astrocitária NFATc3, seja um fator importante nas alterações crônicas encontradas nesse modelo de DA.

Referências

ABDUL, H. M. et al. NFATs and Alzheimer's Disease. **Mol Cell Pharmacol**, v. 2, n. 1, p. 7-14, Jan 01 2010.

ABDUL, H. M. et al. Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling. **J Neurosci**, v. 29, n. 41, p. 12957-69, Oct 14 2009.

AGOSTINHO, P.; CUNHA, R. A.; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 25, p. 2766-78, 2010.

AKIYAMA, H. et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 21, n. 3, p. 383-421, May-Jun 2000.

ALLAMAN, I.; BELANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Front Neurosci**, v. 9, p. 23, 2015.

ALONSO, A. C. et al. Mechanism of tau-induced neurodegeneration in Alzheimer disease and related tauopathies. **Curr Alzheimer Res**, v. 5, n. 4, p. 375-84, Aug 2008.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2010 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v. 6, n. 2, p. 158-94, Mar 2010.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Neurocognitive Disorders. In: (Ed.). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5th. Washington, DC, 2013.

ANDERSON, D. C.; KODUKULA, K. Biomarkers in pharmacology and drug discovery. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. 172-88, Jan 01 2014.

ARORA, R. B.; KUMAR, K.; DESHMUKH, R. R. FK506 attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced neurotoxicity in rats. **Behav Pharmacol**, v. 24, n. 7, p. 580-9, Oct 2013.

ASHE, K. H.; ZAHS, K. R. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. **Neuron**, v. 66, n. 5, p. 631-45, Jun 10 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. A cada três segundos, um idoso é diagnosticado com algum tipo de demência no mundo. 2016. Disponível em: <<http://www.abraz.org.br/node/760>>.

ATTWELL, D.; IADECOLA, C. The neural basis of functional brain imaging signals. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 12, p. 621-5, Dec 2002.

AVILA-MUNOZ, E.; ARIAS, C. When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. **Ageing Res Rev**, v. 18, p. 29-40, Nov 2014.

BALUCHNEJADMOJARAD, T. et al. S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. **Eur J Pharmacol**, v. 794, p. 69-76, Jan 05 2017.

BANKS, W. A.; OWEN, J. B.; ERICKSON, M. A. Insulin in the brain: there and back again. **Pharmacol Ther**, v. 136, n. 1, p. 82-93, Oct 2012.

BASSANI, T. B. et al. Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Rats. **Mol Neurobiol**, Jun 16 2017.

BATASSINI, C. et al. Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B. **Neural Plast**, v. 2015, p. 387028, 2015.

BEDSE, G. et al. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. **Front Neurosci**, v. 9, p. 204, 2015.

BERTI, V.; MOSCONI, L.; PUPI, A. Brain: normal variations and benign findings in fluorodeoxyglucose-PET/computed tomography imaging. **PET Clin**, v. 9, n. 2, p. 129-40, Apr 2014.

BIASIBETTI, R. et al. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. **Behav Brain Res**, v. 316, p. 205-214, Jan 01 2017.

BIESSELS, G. J.; KAPPELLE, L. J.; UTRECHT DIABETIC ENCEPHALOPATHY STUDY, G. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? **Biochem Soc Trans**, v. 33, n. Pt 5, p. 1041-4, Nov 2005.

BILLINGS, L. M. et al. Learning decreases A beta*56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 4, p. 751-61, Jan 24 2007.

BLESSED, G.; TOMLINSON, B. E.; ROTH, M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. **Br J Psychiatry**, v. 114, n. 512, p. 797-811, Jul 1968.

BOMFIM, T. R. et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated Abeta oligomers. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1339-53, Apr 2012.

BORNSTEIN, N. M. et al. Diabetes and the brain: issues and unmet needs. **Neurol Sci**, v. 35, n. 7, p. 995-1001, Jul 2014.

BRAAK, E. et al. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 249 Suppl 3, p. 14-22, 1999.

BROETTO, N. et al. Intracerebroventricular administration of okadaic acid induces hippocampal glucose uptake dysfunction and tau phosphorylation. **Brain Res Bull**, v. 124, p. 136-43, Jun 2016.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, Dec 13 2001.

BRUNDEN, K. R.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 10, p. 783-93, Oct 2009.

BURGERING, B. M.; COFFER, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. **Nature**, v. 376, n. 6541, p. 599-602, Aug 17 1995.

BUTTERFIELD, D. A. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. **Free Radic Res**, v. 36, n. 12, p. 1307-13, Dec 2002.

CANELLADA, A. et al. Calcium/calcineurin signaling in primary cortical astrocyte cultures: Rcan1-4 and cyclooxygenase-2 as NFAT target genes. **Glia**, v. 56, n. 7, p. 709-22, May 2008.

- CARAVEO, G. et al. Calcineurin determines toxic versus beneficial responses to alpha-synuclein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 34, p. E3544-52, Aug 26 2014.
- CARDONA-GOMEZ, G. P.; LOPERA, F. Dementia, Preclinical Studies in Neurodegeneration and its Potential for Translational Medicine in South America. **Front Aging Neurosci**, v. 8, p. 304, 2016.
- CARTIER, L. et al. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 48, n. 1, p. 16-42, Feb 2005.
- CASADESUS, G. et al. Indices of metabolic dysfunction and oxidative stress. **Neurochem Res**, v. 32, n. 4-5, p. 717-22, Apr-May 2007.
- CHATHAM, J. C. et al. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. **Shock**, v. 29, n. 4, p. 431-40, Apr 2008.
- CHEN, Y. et al. Intracerebroventricular streptozotocin exacerbates Alzheimer-like changes of 3xTg-AD mice. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 1, p. 547-62, Feb 2014.
- CHEN, Y. et al. Brain gene expression of a sporadic (icv-STZ Mouse) and a familial mouse model (3xTg-AD mouse) of Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51432, 2012.
- CLINTON, L. K. et al. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. **Neurobiol Dis**, v. 28, n. 1, p. 76-82, Oct 2007.
- COOK, D. G. et al. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. **Am J Pathol**, v. 162, n. 1, p. 313-9, Jan 2003.
- CORACI, I. S. et al. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. **Am J Pathol**, v. 160, n. 1, p. 101-12, Jan 2002.
- COSTA, A. P. et al. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 2, p. 420-7, Jan 15 2012.

CRABTREE, G. R.; OLSON, E. N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. **Cell**, v. 109 Suppl, p. S67-79, Apr 2002.

CRAFT, J. M. et al. Enhanced susceptibility of S-100B transgenic mice to neuroinflammation and neuronal dysfunction induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. **Glia**, v. 51, n. 3, p. 209-16, Aug 15 2005.

CUNNANE, S. et al. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. **Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 3-20, Jan 2011.

DAVIDSON, T. L.; JARRARD, L. E. A role for hippocampus in the utilization of hunger signals. **Behav Neural Biol**, v. 59, n. 2, p. 167-71, Mar 1993.

DE FELICE, F. G. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. **J Clin Invest**, v. 123, n. 2, p. 531-9, Feb 2013.

DE FELICE, F. G.; LOURENCO, M. V.; FERREIRA, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? **Alzheimers Dement**, v. 10, n. 1 Suppl, p. S26-32, Feb 2014.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **J Diabetes Sci Technol**, v. 2, n. 6, p. 1101-13, Nov 2008.

DEL BO, R. et al. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and beta-amyloid production in cultures. **Neurosci Lett**, v. 188, n. 1, p. 70-4, Mar 16 1995.

DELACOURTE, A.; BUEE, L. Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. **Curr Opin Neurol**, v. 13, n. 4, p. 371-6, Aug 2000.

DELCOMMENNE, M. et al. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 19, p. 11211-6, Sep 15 1998.

DENG, Y. et al. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, v. 175, n. 5, p. 2089-98, Nov 2009.

- DEWIL, M.; VAN DEN BOSCH, L.; ROBBERECHT, W. Microglia in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neurol Belg**, v. 107, n. 3, p. 63-70, Sep 2007.
- DODD, G. T.; TIGANIS, T. Insulin Action in the Brain: Roles in Energy and Glucose Homeostasis. **J Neuroendocrinol**, Jul 31 2017.
- DONATO, R. et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 6, p. 1008-22, Jun 2009.
- DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol**, v. 62, n. 6, p. 649-71, Dec 2000.
- DUDEK, H. et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. **Science**, v. 275, n. 5300, p. 661-5, Jan 31 1997.
- DUELLI, R.; KUSCHINSKY, W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. **News Physiol Sci**, v. 16, p. 71-6, Apr 2001.
- EIDENMULLER, J. et al. Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins. **Biochemistry**, v. 39, n. 43, p. 13166-75, Oct 31 2000.
- EILEEN DOLAN, M. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 26, n. 2-3, p. 105-118, Jul 07 1997.
- EL KHOURY, J. et al. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. **Nat Med**, v. 13, n. 4, p. 432-8, Apr 2007.
- EL KHOURY, J. B. et al. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. **J Exp Med**, v. 197, n. 12, p. 1657-66, Jun 16 2003.
- FARRIS, W. et al. 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**, v. 100, n. 7, p. 4162-7, Apr 01 2003.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, S.; ALMEIDA, A.; BOLANOS, J. P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. **Biochem J**, v. 443, n. 1, p. 3-11, Apr 01 2012.

FERNANDEZ, A. M. et al. Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. **J Neurosci**, v. 27, n. 33, p. 8745-56, Aug 15 2007.

FERNANDEZ, A. M. et al. Blockade of the Interaction of Calcineurin with FOXO in Astrocytes Protects Against Amyloid-beta-Induced Neuronal Death. **J Alzheimers Dis**, v. 52, n. 4, p. 1471-8, Apr 12 2016.

FERNANDEZ, A. M. et al. Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. **Mol Psychiatry**, v. 17, n. 7, p. 705-18, Jul 2012.

FOSTER, J. M.; CARMINES, P. K.; POLLOCK, J. S. PP2B-dependent NO production in the medullary thick ascending limb during diabetes. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 297, n. 2, p. F471-80, Aug 2009.

FREUDE, S. et al. Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3343-8, Dec 2005.

FROLICH, L. et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 105, n. 4-5, p. 423-38, 1998.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 8, p. 551-67, Aug 2016.

FURMAN, J. L.; ARTIUSHIN, I. A.; NORRIS, C. M. Disparate effects of serum on basal and evoked NFAT activity in primary astrocyte cultures. **Neurosci Lett**, v. 469, n. 3, p. 365-9, Jan 29 2010.

FURMAN, J. L.; NORRIS, C. M. Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 158, Sep 10 2014.

FURMAN, J. L. et al. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 32, n. 46, p. 16129-40, Nov 14 2012.

FURMAN, J. L. et al. Blockade of Astrocytic Calcineurin/NFAT Signaling Helps to Normalize Hippocampal Synaptic Function and Plasticity in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. **J Neurosci**, v. 36, n. 5, p. 1502-15, Feb 03 2016.

GAIKWAD, S.; NAVEEN, C.; AGRAWAL-RAJPUT, R. Toll-like receptor-4 antagonism mediates benefits during neuroinflammation. **Neural Regen Res**, v. 11, n. 4, p. 552-3, Apr 2016.

GALVIN, J. E. et al. Predictors of preclinical Alzheimer disease and dementia: a clinicopathologic study. **Arch Neurol**, v. 62, n. 5, p. 758-65, May 2005.

GARDEN, G. A. Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 240-51, Nov 2002.

GARRIDO, R.; MENEZES, P. R. [Impact on caregivers of elderly patients with dementia treated at a psychogeriatric service]. **Rev Saude Publica**, v. 38, n. 6, p. 835-41, Dec 2004.

GARWOOD, C. et al. Calcium dysregulation in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 39, n. 7, p. 788-99, Dec 2013.

GASPARINI, L.; XU, H. Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 8, p. 404-6, Aug 2003.

GEROZISSIS, K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. **Cell Mol Neurobiol**, v. 23, n. 1, p. 1-25, Feb 2003.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 120, n. 3, p. 885-90, May 16 1984.

GOEDERT, M. et al. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 11, p. 5066-70, Jun 01 1993.

GONCALVES, C. A.; LEITE, M. C.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clin Biochem**, v. 41, n. 10-11, p. 755-63, Jul 2008.

GONG, C. X.; IQBAL, K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 23, p. 2321-8, 2008.

GONG, C. X. et al. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation. **J Alzheimers Dis**, v. 9, n. 1, p. 1-12, Mar 2006.

GRAEF, I. A. et al. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. **Cell**, v. 105, n. 7, p. 863-75, Jun 29 2001.

GRAEF, I. A. et al. L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 703-8, Oct 14 1999.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 415-45, 2011.

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

GRINBERG, L. T. et al. Prevalence of dementia subtypes in a developing country: a clinicopathological study. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 8, p. 1140-5, 2013.

GRUNBLATT, E. et al. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **J Neurochem**, v. 101, n. 3, p. 757-70, May 2007.

GRUNDKE-IQBAL, I. et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 13, p. 4913-7, Jul 1986.

- GU, Y. et al. Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. **J Biol Chem**, v. 276, n. 38, p. 35235-8, Sep 21 2001.
- GUO, Z. et al. Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. **Sci Rep**, v. 7, p. 45971, Apr 06 2017.
- HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 2, p. 101-12, Feb 2007.
- HALLIDAY, G. et al. Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 27, n. 1-2, p. 1-8, Jan-Feb 2000.
- HAN, J. W. et al. Nuclear factor-erythroid-2 related transcription factor-1 (Nrf1) is regulated by O-GlcNAc transferase. **Free Radic Biol Med**, v. 110, p. 196-205, Sep 2017.
- HANGER, D. P.; SEEREERAM, A.; NOBLE, W. Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Expert Rev Neurother**, v. 9, n. 11, p. 1647-66, Nov 2009.
- HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-6, Jul 19 2002.
- HENNEBERG, N.; HOYER, S. Desensitization of the neuronal insulin receptor: a new approach in the etiopathogenesis of late-onset sporadic dementia of the Alzheimer type (SDAT)? **Arch Gerontol Geriatr**, v. 21, n. 1, p. 63-74, Jul-Aug 1995.
- HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 358-72, Jun 2015.
- HERRERA, E., JR. et al. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 16, n. 2, p. 103-8, Apr-Jun 2002.
- HILIOTI, Z.; CUNNINGHAM, K. W. The RCN family of calcineurin regulators. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 311, n. 4, p. 1089-93, Nov 28 2003.

HO, G. J. et al. Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 2, p. 247-56, Apr 2005.

HOFFMAN, J. M. et al. FDG PET imaging in patients with pathologically verified dementia. **J Nucl Med**, v. 41, n. 11, p. 1920-8, Nov 2000.

HORSLEY, V.; PAVLATH, G. K. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. **J Cell Biol**, v. 156, n. 5, p. 771-4, Mar 04 2002.

HOSHI, M. et al. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 7, p. 2719-23, Apr 02 1996.

HOYER, S. Oxidative energy metabolism in Alzheimer brain. Studies in early-onset and late-onset cases. **Mol Chem Neuropathol**, v. 16, n. 3, p. 207-24, Jun 1992.

_____. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. **Eur J Pharmacol**, v. 490, n. 1-3, p. 115-25, Apr 19 2004.

HOYER, S.; NITSCH, R. Cerebral excess release of neurotransmitter amino acids subsequent to reduced cerebral glucose metabolism in early-onset dementia of Alzheimer type. **J Neural Transm**, v. 75, n. 3, p. 227-32, 1989.

HOYER, S.; NITSCH, R.; OESTERREICH, K. Ammonia is endogenously generated in the brain in the presence of presumed and verified dementia of Alzheimer type. **Neurosci Lett**, v. 117, n. 3, p. 358-62, Sep 18 1990.

HUANG, H. J. et al. Exendin-4 protected against cognitive dysfunction in hyperglycemic mice receiving an intrahippocampal lipopolysaccharide injection. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e39656, 2012.

INIGUEZ, M. A. et al. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. **J Biol Chem**, v. 275, n. 31, p. 23627-35, Aug 04 2000.

IQBAL, K. et al. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. **Acta Neuropathol**, v. 118, n. 1, p. 53-69, Jul 2009.

ISHRAT, T. et al. Effects of Pycnogenol and vitamin E on cognitive deficits and oxidative damage induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Behav Pharmacol**, v. 20, n. 7, p. 567-75, Oct 2009.

JALBERT, J. J.; DAIELLO, L. A.; LAPANE, K. L. Dementia of the Alzheimer type. **Epidemiol Rev**, v. 30, p. 15-34, 2008.

JAVED, H. et al. Effect of hesperidin on neurobehavioral, neuroinflammation, oxidative stress and lipid alteration in intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment in mice. **J Neurol Sci**, v. 348, n. 1-2, p. 51-9, Jan 15 2015.

JIANG, Z. et al. Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 18997-9007, May 23 2003.

JOHN, G. R.; LEE, S. C.; BROSNAN, C. F. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. **Neuroscientist**, v. 9, n. 1, p. 10-22, Feb 2003.

JOHNS, E. K. et al. Executive functions in frontotemporal dementia and Lewy body dementia. **Neuropsychology**, v. 23, n. 6, p. 765-77, Nov 2009.

JUNOD, A. et al. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 126, n. 1, p. 201-5, Oct 1967.

KAGAN, B. L.; THUNDIMADATHIL, J. Amyloid peptide pores and the beta sheet conformation. **Adv Exp Med Biol**, v. 677, p. 150-67, 2010.

KAWAMOTO, E. M. et al. TLR4-dependent metabolic changes are associated with cognitive impairment in an animal model of type 1 diabetes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 443, n. 2, p. 731-7, Jan 10 2014.

KAWAMURA, T.; UMEMURA, T.; HOTTA, N. Cognitive impairment in diabetic patients: Can diabetic control prevent cognitive decline? **J Diabetes Investig**, v. 3, n. 5, p. 413-23, Oct 18 2012.

KAWAS, C. H. Frontiers in human behavioral science. **Neurobiol Aging**, v. 21, n. 6, p. 865; discussion 875-7, Nov-Dec 2000.

KHACHATURIAN, Z. S.; RADEBAUGH, T. S. **Alzheimer's disease : cause(s), diagnosis, treatment and care.** Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1996. ISBN 0849389976 9780849389979.

KIM, H. et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 1348-58, Dec 2006.

KITADA, S. et al. Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. **Am J Pathol**, v. 152, n. 1, p. 51-61, Jan 1998.

KLEIN, A. L. et al. O-linked N-acetylglucosamine modification of insulin receptor substrate-1 occurs in close proximity to multiple SH2 domain binding motifs. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2733-45, Dec 2009.

KLEINDIENST, A. et al. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. **Prog Brain Res**, v. 161, p. 317-25, 2007.

KNEZOVIC, A. et al. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 122, n. 4, p. 577-92, Apr 2015.

KONRAD, R. J. et al. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. **Biochem J**, v. 356, n. Pt 1, p. 31-41, May 15 2001.

KRENTZ, A. J. Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab**, v. 5 Suppl 1, p. S19-27, Nov 2003.

KULIK, G.; KLIPPEL, A.; WEBER, M. J. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 3, p. 1595-606, Mar 1997.

KUMAR, A.; SINGH, N. Calcineurin inhibitors improve memory loss and neuropathological changes in mouse model of dementia. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 153, p. 147-159, Feb 2017.

LACKOVIC, Z.; REBIC, V.; RIEDERER, P. F. Single intracerebroventricular injection of botulinum toxin type A produces slow onset and long-term memory impairment in rats. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 116, n. 10, p. 1273-80, Oct 2009.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N. Animal models of Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 11, Nov 01 2012.

LAM, K. et al. The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. **J Biol Chem**, v. 269, n. 32, p. 20648-52, Aug 12 1994.

LAMMICH, S. et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 7, p. 3922-7, Mar 30 1999.

LANDRETH, G. E.; REED-GEAGHAN, E. G. Toll-like receptors in Alzheimer's disease. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 336, p. 137-53, 2009.

LEAL, R. B. et al. S100B protein stimulates calcineurin activity. **Neuroreport**, v. 15, n. 2, p. 317-20, Feb 09 2004.

LECLERC, B.; ABULROB, A. Perspectives in molecular imaging using staging biomarkers and immunotherapies in Alzheimer's disease. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 589308, 2013.

LEE, Y. J. et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Arch Pharm Res**, v. 33, n. 10, p. 1539-56, Oct 2010.

LEIBSON, C. L. et al. The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. **Ann N Y Acad Sci**, v. 826, p. 422-7, Sep 26 1997.

LI, H.; RAO, A.; HOGAN, P. G. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. **Trends Cell Biol**, v. 21, n. 2, p. 91-103, Feb 2011.

LI, X. et al. Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. **Eur J Neurosci**, v. 23, n. 8, p. 2078-86, Apr 2006.

LILIENBAUM, A.; ISRAEL, A. From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 8, p. 2680-98, Apr 2003.

LING, Y.; MORGAN, K.; KALSHEKER, N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 11, p. 1505-35, Nov 2003.

LIU, H. C.; BALTIMORE, D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. **Curr Opin Cell Biol**, v. 5, n. 3, p. 477-87, Jun 1993.

LIU, F. et al. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 132, n. Pt 7, p. 1820-32, Jul 2009.

LIU, H. et al. Aging of cerebral white matter. **Ageing Res Rev**, v. 34, p. 64-76, Mar 2017.

LIU, J. O. Endogenous protein inhibitors of calcineurin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 311, n. 4, p. 1103-9, Nov 28 2003.

LIU, K. et al. Accumulation of protein O-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high O-GlcNAc metabolism. **J Neurochem**, v. 89, n. 4, p. 1044-55, May 2004.

LIU, T. et al. Amyloid-beta-induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. **J Neurochem**, v. 88, n. 3, p. 554-63, Feb 2004.

LIU, Y. et al. Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 111, n. 1, p. 242-9, Oct 2009.

_____. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. **J Pathol**, v. 225, n. 1, p. 54-62, Sep 2011.

LIU, Z. et al. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/calcineurin signaling is a novel pathway regulating intracellular calcium accumulation which might be involved in ventricular arrhythmias in diabetic cardiomyopathy. **Cell Signal**, v. 26, n. 12, p. 2591-600, Dec 2014.

- LOVE, D. C.; HANOVER, J. A. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". **Sci STKE**, v. 2005, n. 312, p. re13, Nov 29 2005.
- LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S232-40, Jan 2006.
- LUE, L. F. et al. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. **Glia**, v. 35, n. 1, p. 72-9, Jul 2001.
- LUI, N. P. et al. Endogenous repair by the activation of cell survival signalling cascades during the early stages of rat Parkinsonism. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51294, 2012.
- MANDREKAR-COLUCCI, S.; LANDRETH, G. E. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 156-67, Apr 2010.
- MARSHALL, S.; BACOTE, V.; TRAXINGER, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **J Biol Chem**, v. 266, n. 8, p. 4706-12, Mar 15 1991.
- MARTIN, L. et al. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. **Ageing Res Rev**, v. 12, n. 1, p. 39-49, Jan 2013.
- MASTRANGELO, M. A.; BOWERS, W. J. Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. **BMC Neurosci**, v. 9, p. 81, Aug 12 2008.
- 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 Res**, v. 532, n. 1-2, p. 95-100, Nov 05 1990.
- MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. 162-71, Jan 01 2014.
- MESSIER, C. Glucose improvement of memory: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 490, n. 1-3, p. 33-57, Apr 19 2004.

MILL, J. F.; CHAO, M. V.; ISHII, D. N. Insulin, insulin-like growth factor II, and nerve growth factor effects on tubulin mRNA levels and neurite formation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 20, p. 7126-30, Oct 1985.

MIRZA, Z. et al. Proteomics approaches to understand linkage between Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 213-25, Mar 2014.

MOHMMAD ABDUL, H. et al. Proteolysis of calcineurin is increased in human hippocampus during mild cognitive impairment and is stimulated by oligomeric A β in primary cell culture. **Aging Cell**, v. 10, n. 1, p. 103-13, Feb 2011.

MOSCONI, L.; PUPI, A.; DE LEON, M. J. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1147, p. 180-95, Dec 2008.

MRAK, R. E. Neuropathology and the neuroinflammation idea. **J Alzheimers Dis**, v. 18, n. 3, p. 473-81, 2009.

MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 22, n. 6, p. 903-8, Nov-Dec 2001.

MRAK, R. E.; SHENG, J. G.; GRIFFIN, W. S. Correlation of astrocytic S100 β expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 55, n. 3, p. 273-9, Mar 1996.

MUKHERJEE, A.; SOTO, C. Role of calcineurin in neurodegeneration produced by misfolded proteins and endoplasmic reticulum stress. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 2, p. 223-30, Apr 2011.

MUNGAS, D. et al. Heterogeneity of cognitive trajectories in diverse older persons. **Psychol Aging**, v. 25, n. 3, p. 606-19, Sep 2010.

MUZIO, L.; MARTINO, G.; FURLAN, R. Multifaceted aspects of inflammation in multiple sclerosis: the role of microglia. **J Neuroimmunol**, v. 191, n. 1-2, p. 39-44, Nov 2007.

MYERS, M. G., JR.; SUN, X. J.; WHITE, M. F. The IRS-1 signaling system. **Trends Biochem Sci**, v. 19, n. 7, p. 289-93, Jul 1994.

NGUYEN, T.; DI GIOVANNI, S. NFAT signaling in neural development and axon growth. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 141-5, Apr 2008.

NITSCH, R.; HOYER, S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. **Neurosci Lett**, v. 128, n. 2, p. 199-202, Jul 22 1991.

NITSCH, R. M. et al. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 5, p. 1671-5, Mar 01 1992.

NOBLE, W. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 19, p. 6990-5, May 10 2005.

NORRIS, C. M. et al. Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. **J Neurosci**, v. 25, n. 18, p. 4649-58, May 04 2005.

O'HARE, T.; PILCH, P. F. Intrinsic kinase activity of the insulin receptor. **Int J Biochem**, v. 22, n. 4, p. 315-24, 1990.

ODDO, S. et al. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 8, p. 1063-70, Dec 2003.

ODDO, S. et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. **Neuron**, v. 39, n. 3, p. 409-21, Jul 31 2003.

OTT, A. et al. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. **Diabetologia**, v. 39, n. 11, p. 1392-7, Nov 1996.

PAL, S.; TYLER, J. K. Epigenetics and aging. **Sci Adv**, v. 2, n. 7, p. e1600584, Jul 2016.

PAN, M. G.; XIONG, Y.; CHEN, F. NFAT gene family in inflammation and cancer. **Curr Mol Med**, v. 13, n. 4, p. 543-54, May 2013.

PARK, C. R. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 4, p. 311-23, Jun 2001.

PARK, C. R.; JOHNSON, L. H. Effect of insulin on transport of glucose and galactose into cells of rat muscle and brain. **Am J Physiol**, v. 182, n. 1, p. 17-23, Jul 1955.

PARPURA, V. et al. Glial cells in (patho)physiology. **J Neurochem**, v. 121, n. 1, p. 4-27, Apr 2012.

PASQUIER, F. et al. Diabetes mellitus and dementia. **Diabetes Metab**, v. 32, n. 5 Pt 1, p. 403-14, Nov 2006.

PATHAN, A. R. et al. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. **Life Sci**, v. 79, n. 23, p. 2209-16, Nov 02 2006.

PELLISTRI, F. et al. Nonspecific interaction of prefibrillar amyloid aggregates with glutamatergic receptors results in Ca²⁺ increase in primary neuronal cells. **J Biol Chem**, v. 283, n. 44, p. 29950-60, Oct 31 2008.

PEREZ-ORTIZ, J. M. et al. Mechanical lesion activates newly identified NFATc1 in primary astrocytes: implication of ATP and purinergic receptors. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 9, p. 2453-65, May 2008.

PEREZ, A. et al. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. **Neurochem Res**, v. 25, n. 2, p. 247-55, Feb 2000.

PEREZ, M. et al. Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. **J Alzheimers Dis**, v. 5, n. 4, p. 301-8, Aug 2003.

PESKIND, E. R. et al. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. **Neurochem Int**, v. 39, n. 5-6, p. 409-13, Nov-Dec 2001.

PETTEGREW, J. W. et al. Changes in brain membrane phospholipid and high-energy phosphate metabolism precede dementia. **Neurobiol Aging**, v. 16, n. 6, p. 973-5, Nov-Dec 1995.

PIEPER, A. A. et al. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, n. 4, p. 171-81, Apr 1999.

PLASCHKE, K.; HOYER, S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. **Int J Dev Neurosci**, v. 11, n. 4, p. 477-83, Aug 1993.

PLEISS, M. M. et al. Calcineurin proteolysis in astrocytes: Implications for impaired synaptic function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 9, p. 1521-32, Sep 2016.

PURO, D. G.; AGARDH, E. Insulin-mediated regulation of neuronal maturation. **Science**, v. 225, n. 4667, p. 1170-2, Sep 14 1984.

QUADRATO, G. et al. Nuclear factor of activated T cells (NFATc4) is required for BDNF-dependent survival of adult-born neurons and spatial memory formation in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 23, p. E1499-508, Jun 05 2012.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 329-44, Jan 28 2010.

RAI, S. et al. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 117, p. 104-17, Feb 2014.

RAJASEKAR, N. et al. Intranasal insulin improves cerebral blood flow, Nrf-2 expression and BDNF in STZ (ICV)-induced memory impaired rats. **Life Sci**, v. 173, p. 1-10, Mar 15 2017.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother Rep**, v. 29, p. 91-8, May 1963.

RAMIREZ-CORREA, G. A. et al. Removal of Abnormal Myofilament O-GlcNAcylation Restores Ca²⁺ Sensitivity in Diabetic Cardiac Muscle. **Diabetes**, v. 64, n. 10, p. 3573-87, Oct 2015.

RAO, A.; LUO, C.; HOGAN, P. G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 707-47, 1997.

REESE, L. C.; TAGLIALATELA, G. A role for calcineurin in Alzheimer's disease. **Curr Neuropharmacol**, v. 9, n. 4, p. 685-92, Dec 2011.

ROBERTS-WILSON, T. K. et al. Calcineurin signaling and PGC-1alpha expression are suppressed during muscle atrophy due to diabetes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1803, n. 8, p. 960-7, Aug 2010.

RODRIGUES, L. et al. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. **J Alzheimers Dis**, v. 17, n. 1, p. 193-202, 2009.

RODRIGUEZ, J. J. et al. Increase in the density of resting microglia precedes neuritic plaque formation and microglial activation in a transgenic model of Alzheimer's disease. **Cell Death Dis**, v. 1, p. e1, 2010.

ROGERS, J. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? **Int Rev Neurobiol**, v. 82, p. 235-46, 2007.

RONNEMAA, E. et al. Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. **Neurology**, v. 71, n. 14, p. 1065-71, Sep 30 2008.

RUSNAK, F.; MERTZ, P. Calcineurin: form and function. **Physiol Rev**, v. 80, n. 4, p. 1483-521, Oct 2000.

RYU, I. H.; LEE, K. Y.; DO, S. I. Abeta-affected pathogenic induction of S-nitrosylation of OGT and identification of Cys-NO linkage triplet. **Biochim Biophys Acta**, v. 1864, n. 5, p. 609-21, May 2016.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **J Neural Transm Suppl**, n. 72, p. 217-33, 2007.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 120, n. 1, p. 233-52, Jan 2013.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. Modeling sporadic Alzheimer's disease: the insulin resistant brain state generates multiple long-term morphobiological abnormalities including hyperphosphorylated tau protein and amyloid-beta. **J Alzheimers Dis**, v. 18, n. 4, p. 729-50, 2009.

- SAMA, M. A. et al. Interleukin-1beta-dependent signaling between astrocytes and neurons depends critically on astrocytic calcineurin/NFAT activity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 32, p. 21953-64, Aug 08 2008.
- SCHACHTER, A. S.; DAVIS, K. L. Alzheimer's disease. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 2, n. 2, p. 91-100, Jun 2000.
- SCHIOTH, H. B. et al. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. **Mol Neurobiol**, v. 46, n. 1, p. 4-10, Aug 2012.
- SCHULINGKAMP, R. J. et al. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 8, p. 855-72, Dec 2000.
- SCHWAB, C.; MCGEER, P. L. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **J Alzheimers Dis**, v. 13, n. 4, p. 359-69, May 2008.
- SERGEANT, N. et al. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. **Expert Rev Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 207-24, Apr 2008.
- SERRANO-PEREZ, M. C. et al. Response of transcription factor NFATc3 to excitotoxic and traumatic brain insults: identification of a subpopulation of reactive astrocytes. **Glia**, v. 59, n. 1, p. 94-107, Jan 2011.
- SHAH, K.; DESILVA, S.; ABBRUSCATO, T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 10, p. 12629-55, Oct 03 2012.
- SHARMA, M.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sci**, v. 68, n. 9, p. 1021-9, Jan 19 2001.
- SHEMER, J. et al. Insulin and IGF-I stimulate phosphorylation of their respective receptors in intact neuronal and glial cells in primary culture. **J Mol Neurosci**, v. 1, n. 1, p. 3-8, 1989.
- SHI, L. et al. A novel dual GLP-1/GIP receptor agonist alleviates cognitive decline by re-sensitizing insulin signaling in the Alzheimer icv. STZ rat model. **Behav Brain Res**, v. 327, p. 65-74, Jun 01 2017.

SHIVARAMA SHETTY, M.; SAJIKUMAR, S. 'Tagging' along memories in aging: Synaptic tagging and capture mechanisms in the aged hippocampus. **Ageing Res Rev**, v. 35, p. 22-35, May 2017.

SHULMAN, R. G. et al. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 8, p. 489-95, Aug 2004.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010.

SOMPOL, P. et al. Calcineurin/NFAT Signaling in Activated Astrocytes Drives Network Hyperexcitability in Abeta-Bearing Mice. **J Neurosci**, v. 37, n. 25, p. 6132-6148, Jun 21 2017.

SPRINGER, J. E. et al. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 20, n. 19, p. 7246-51, Oct 01 2000.

STEEN, E. et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **J Alzheimers Dis**, v. 7, n. 1, p. 63-80, Feb 2005.

SUN, X. J. et al. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 12, p. 7418-28, Dec 1993.

SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73-7, Jul 04 1991.

SUZUKI, N. et al. High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. **Am J Pathol**, v. 145, n. 2, p. 452-60, Aug 1994.

SWAROWSKY, A. et al. Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. **Behav Brain Res**, v. 190, n. 2, p. 206-11, Jul 19 2008.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 2, p. S265-79, 2010.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-46, 2001.

TAKEDA, S. et al. Molecular mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer disease: beta-amyloid peptide, insulin signaling, and neuronal function. **Mol Biosyst**, v. 7, n. 6, p. 1822-7, Jun 2011.

TANSEY, M. G.; MCCOY, M. K.; FRANK-CANNON, T. C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Exp Neurol**, v. 208, n. 1, p. 1-25, Nov 2007.

TIAN, Q. et al. Biphasic effects of forskolin on tau phosphorylation and spatial memory in rats. **J Alzheimers Dis**, v. 17, n. 3, p. 631-42, 2009.

TOKUTAKE, T. et al. Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid-beta at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3beta signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 287, n. 42, p. 35222-33, Oct 12 2012.

TRAMONTINA, A. C. et al. The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 118, n. 11, p. 1641-9, Nov 2011.

TRINCZEK, B. et al. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. **Mol Biol Cell**, v. 6, n. 12, p. 1887-902, Dec 1995.

TROJANOWSKI, J. Q. et al. Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex: transgenic mice provide insights into mechanisms underlying a common tauopathy in an ethnic minority on Guam. **Exp Neurol**, v. 176, n. 1, p. 1-11, Jul 2002.

TURK, J. et al. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 197, n. 3, p. 1458-64, Dec 30 1993.

ULLRICH, A. et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. **Nature**, v. 313, n. 6005, p. 756-61, Feb 28-Mar 6 1985.

VAN EXEL, E. et al. Vascular factors and markers of inflammation in offspring with a parental history of late-onset Alzheimer disease. **Arch Gen Psychiatry**, v. 66, n. 11, p. 1263-70, Nov 2009.

VERKHRATSKY, A. et al. Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. **ASN Neuro**, v. 4, n. 3, Apr 05 2012.

VICENTE, E. et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Brain Res**, v. 1251, p. 204-12, Jan 28 2009.

VIHMA, H.; PRUUNSILD, P.; TIMMUSK, T. Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 279-91, Nov 2008.

VILLEMAGNE, V. L. et al. Abeta-amyloid and Tau Imaging in Dementia. **Semin Nucl Med**, v. 47, n. 1, p. 75-88, Jan 2017.

VIRKAMAKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 103, n. 7, p. 931-43, Apr 1999.

WALKER, D. G.; KIM, S. U.; MCGEER, P. L. Complement and cytokine gene expression in cultured microglial derived from postmortem human brains. **J Neurosci Res**, v. 40, n. 4, p. 478-93, Mar 01 1995.

WALKER, D. G.; LUE, L. F. Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 3, p. 412-25, Aug 01 2005.

WALKER, D. G.; LUE, L. F.; BEACH, T. G. Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. **Neurobiol Aging**, v. 22, n. 6, p. 957-66, Nov-Dec 2001.

WANG, J. Z.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. **Eur J Neurosci**, v. 25, n. 1, p. 59-68, Jan 2007.

- WARTCHOW, K. M. et al. Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism. **Neurochem Res**, v. 41, n. 6, p. 1420-9, Jun 2016.
- WATSON, G. S.; CRAFT, S. Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol**, v. 490, n. 1-3, p. 97-113, Apr 19 2004.
- WHELAN, S. A. et al. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. **J Biol Chem**, v. 285, n. 8, p. 5204-11, Feb 19 2010.
- WHITE, M. F.; MARON, R.; KAHN, C. R. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. **Nature**, v. 318, n. 6042, p. 183-6, Nov 14-20 1985.
- WU, H. Y. et al. Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. **J Neurosci**, v. 30, n. 7, p. 2636-49, Feb 17 2010.
- WU, H. Y. et al. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. **J Biol Chem**, v. 279, n. 6, p. 4929-40, Feb 06 2004.
- WU, Y. et al. Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation. **EMBO J**, v. 26, n. 12, p. 2981-90, Jun 20 2007.
- XU, J. et al. Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. **Glia**, v. 64, n. 11, p. 1869-78, Nov 2016.
- XU, J. et al. Regulation of the proteasome by AMPK in endothelial cells: the role of O-GlcNAc transferase (OGT). **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36717, 2012.
- YAN, H. Q. et al. Differential effect of traumatic brain injury on the nuclear factor of activated T Cells C3 and C4 isoforms in the rat hippocampus. **Brain Res**, v. 1548, p. 63-72, Feb 22 2014.

YUZWA, S. A.; VOCADLO, D. J. O-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond. **Chem Soc Rev**, v. 43, n. 19, p. 6839-58, Oct 07 2014.

ZHANG, F. et al. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 715-25, Dec 12 2003.

ZILKA, N.; FERENCIK, M.; HULIN, I. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promoter? **Bratisl Lek Listy**, v. 107, n. 9-10, p. 374-83, 2006.

ZUSSY, C. et al. Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid beta fragment in rats. **Am J Pathol**, v. 179, n. 1, p. 315-34, Jul 2011.

Anexos

Artigos publicados em colaboração durante o período de doutorado.

1. Biasibetti, R.; **Dos Santos, J. P. A.**; Rodrigues, L.; Wartchow, K. M.; Suardi, L. Z.; Nardin, P.; Selistre, N. G.; Vázquez, D; Gonçalves, C. A.
Hippocampal Changes in STZ-Model of Alzheimer's Disease are Dependent on Sex. *Behavioural Brain Research*, v. 316, p. 205-214, 2017.
2. Bellaver, B.; **Dos Santos, J. P.**; Leffa, D. T.; Bobermin, L. D.; Roppa, P. H. A.; Da Silva Torres, I. L.; Gonçalves, C. A.; Souza, D. O.; Quincozes-Santos, A.
Systemic Inflammation as a Driver of Brain Injury: The Astrocyte as an Emerging Player. *Molecular Neurobiology*, v. 54, p. 1, 2017.
3. Longoni, A.; Kolling, J.; Siebert, C.; **Dos Santos, J. P.**; Da Silva, J. S.; Pettenuzzo, L. F.; Meira-Martins, L. A.; Gonçalves, C. A.; De Assis, A. M.; Wyse, A. T.S.
1,25-Dihydroxyvitamin D3 Prevents Deleterious Effects of Homocysteine on Mitochondrial Function and Redox Status in Heart Slices. *Nutrition Research*, v. 38, p. 52-63, 2017.
4. Longoni, A.; Kolling, J.; Dos Santos, T. M.; **Dos Santos, J. P.**; Da Silva, J. S.; Pettenuzzo, L.; Gonçalves, C. A.; De Assis, A. M.; Quincozes-Santos, A.; Wyse, A. T.S.
1,25-Dihydroxyvitamin D3 Exerts Neuroprotective Effects in an ExVivo Model of Mild Hyperhomocysteinemia. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 48, p. 71-79, 2016.
5. Serafini, M. R.; Vergne, D. M.; Menezes, P. P.; **Santos, João P. A.**; Rabelo, Thallita K.; Saravanan, S.; Alves, P. B.; Costa, E. V.; Quintans Junior, L. J.
Characterization and Evaluation of the Antioxidant Activity of Calamusenone, a Major Component of Hyptis Pectinata (L.) Poit Essential Oil. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 14, p. 1000, 2016.
6. Broetto, N.; Hansen, F.; Brolese, G.; Batassini, C.; Lirio, F.; Galland, F.; **Dos Santos, J. P. A.**; Dutra, M. F.; Gonçalves, C. A.
Intracerebroventricular Administration of Okadaic Acid Induces Hippocampal Glucose Uptake Dysfunction and Tau Phosphorylation. *Brain Research Bulletin*, v. 124, p. 136-143, 2016.
7. Vilela, T.C.; Scaini, G.; Furlanetto, C.B.; Pasquali, M. A. B.; **Santos, João Paulo A.**; Gelain, D. P.; Moreira, J. C. F.; Schuck, P. F.; Ferreira, G. C.; Streck, E. L.
Apoptotic Signaling Pathways Induced by Acute Administration of Branched-Chain Amino Acids in an Animal Model of Maple Syrup Urine Disease. *Metabolic Brain Disease*, v. 31, p. 1, 2016.
8. Lima, B. S.; Ramos, C. S.; **Santos, J. P. A.**; Rabelo, T. K.; Serafini, M. R.; Souza, C. A. S.; Silva, F. A.

Development of Standardized Extractive Solution from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) by Factorial. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)*, v. 25, p. 301-306, 2015.

9. Brito, F. A.; Barreto, E. O.; Serafini, M. R.; **Dos Santos, J. P. A.**; Lima, B. S.; Walker, C. I. B.; Silva, F. A.; Quintans-Junior, L. J.; Gelain, D. P.; Araujo, A. A. S.

Anti-Inflammatory Property and Redox Profile of the Leaves Extract from *Morinda citrifolia* L. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 9, p. 693-701, 2015.

