

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO VITOR MELLO HORTEGA

ESTUDO DA DOENÇA DE ALZHEIMER EM UM MODELO ANIMAL
ANÁLISE DAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE EM RATOS
INDUZIDOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

CURITIBA

2021

JOÃO VITOR MELLO HORTEGA

ESTUDO DA DOENÇA DE ALZHEIMER EM UM MODELO ANIMAL
ANÁLISE DAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE EM RATOS
INDUZIDOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza.

Coorientadora: Saritha Suellen Lopes da Silva.

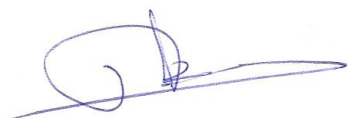
CURITIBA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DA DOENÇA DE ALZHEIMER EM UM MODELO ANIMAL

Monografia aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel, Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Orientador – Departamento de Genética – UFPR



Profª. Dra. Luciane Viater Turek.
Departamento de Genética – UFPR



Dra. Mayza Teixeira.
Departamento de Genética – UFPR

Curitiba, 23 de dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Ricardo, quem permitiu a realização desse trabalho e esteve sempre disponível para ajudar com toda a calma e paciência possível, e a Profª Lupe, quem abriu as portas do Laboratório de Polimorfismos para mim no início da minha graduação, ainda sem experiência alguma.

À Saritha e à Ana, colegas de pesquisa, por toda ajuda, apoio, risadas e momentos de desespero divididos no decorrer desse trabalho.

Às minhas colegas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, e em especial à Carla, pesquisadoras a quem devo por todo o conhecimento, apoio e momentos de alegria compartilhados no decorrer dos anos.

Aos amigos e familiares, que me incentivaram nos meus momentos de incerteza e que tornaram a minha passagem pela graduação um período mais leve e de grande crescimento.

Agradeço também às instituições de fomento, que tornam possível a realização desse trabalho e o desenvolvimento da ciência no nosso país.

RESUMO

Com o aumento do número de pessoas com idade avançada na população, houve também aumento no caso de doenças neurodegenerativas. Essas doenças afetam sistemas ligados ao armazenamento de memórias, raciocínio, coordenação e até mudanças comportamentais, entre essas patologias podemos citar a Doença de Alzheimer (DA). A maior ocorrência da DA fez urgir a necessidade de implantação de métodos que viabilizassem o estudo da mesma em diversas fases do seu desenvolvimento e que facilitam a obtenção de amostras teciduais. Com isso foram desenvolvidas metodologias que utilizam modelos animais. Uma das alternativas faz uso de ratos induzidos ao desenvolvimento da DA a partir da estreptozotocina (STZ), fármaco que desencadeia em uma cascata de processos que se assemelham a DA. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo investigar se a indução da doença de Alzheimer em modelo animal é associada a mudanças no padrão de atividade de enzimas relacionadas a via colinérgica da doença. Para isso foram utilizados 40 ratos Wistar submetidos a cirurgia para a injeção da STZ e para estabelecer um grupo controle. Após 30 dias metade dos animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de fígado, cérebro (córtex e hipocampo) e plasma para a medição da atividade das enzimas AChE e BChE, com 120 dias os animais restantes foram eutanasiados para coleta. Com os dados obtidos com as análises das amostras foram notadas alterações ocasionadas pela injeção droga nas funções cognitivas dos animais. No desenvolvimento corporal houve uma notável diferença entre os grupos controle (SHAM) e os submetidos à droga (STZ), que tiveram pesos bem menores, e nas atividades das enzimas AChE e BChE, principalmente na região do hipocampo cerebral, em que houve uma diminuição das mesmas, possivelmente devido a uma tentativa de uma via compensatória aos efeitos da droga.

Palavras-chave: Demência. AChE. BChE. Ratos Wistar. Estreptozotocina.

ABSTRACT

With the increase in the number of elderly people in the population, there was also an increase in the case of neurodegenerative diseases. These diseases affect systems linked to memory storage, reasoning, coordination and even behavioral changes, among these pathologies we can mention Alzheimer's Disease (AD). The greater occurrence of AD has urged the need to implement methods that would enable the study of it at different stages of its development and which facilitate the obtaining of tissue samples. With that, methodologies were developed that use animal models. One of the alternatives uses rats induced to develop AD from streptozotocin (STZ), a drug that triggers a cascade of processes that resemble AD. Therefore, this study aimed to investigate whether the induction of Alzheimer's disease in an animal model is associated with changes in the pattern of activity of enzymes related to the cholinergic pathway of the disease. For this, 40 Wistar rats underwent surgery for the injection of STZ and to establish a control group. After 30 days, half of the animals were euthanized and liver, brain (cortex and hippocampus) and plasma samples were collected to measure the activity of AChE and BChE enzymes, at 120 days the remaining animals were euthanized for collection. With the data obtained from the analysis of the samples, alterations caused by the drug injection in the cognitive functions of the animals were noticed. In body development there was a notable difference between the control (SHAM) and drug-treated (STZ) groups, which had much lower weights, and in the activities of AChE and BChE enzymes, especially in the hippocampus region of the brain, where there was a decrease of the same, possibly due to an attempt at a compensatory route to the drug's effects.

Key-words: Dementia. AChE. BChE. Wistar rats. Streptozotocin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	15
FIGURA 2 – EXPOSIÇÃO E PERFURAÇÃO DO CRÂNIO.	21
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DO TESTE DO CA.	22
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DO TLO E TRO.	24
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DO TLY.	25
FIGURA 6 - GRÁFICO COMPARATIVO DOS PESOS MÉDIOS DOS GRUPOS SHAM E STZ.	30
FIGURA 7 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AChE NO HIPOCAMPO.....	32
FIGURA 8 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE NO HIPOCAMPO.....	33
FIGURA 9 – TABELAS DE CORRELAÇÃO DAS AMOSTRAS ENTRE O GRUPO SHAM COM 30 DIAS.	34
FIGURA 10 – TABELAS DE CORRELAÇÃO DAS AMOSTRAS ENTRE O GRUPO SHAM COM 120 DIAS.	35
FIGURA 11 – TABELAS DE CORRELAÇÃO DAS AMOSTRAS ENTRE O GRUPO STZ COM 30 DIAS.	36
FIGURA 12 – TABELAS DE CORRELAÇÃO DAS AMOSTRAS ENTRE O GRUPO STZ COM 120 DIAS.	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FATORES DE RISCO E PROTETIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.	17
TABELA 2 – VALORES DE P RELATIVOS À COMPARAÇÃO DOS PESOS MÉDIOS DOS GRUPOS SHAM E STZ.	31
TABELA 3 – DATAS DAS PESAGENS DOS ANIMAIS.....	31
TABELA 4 - MÉDIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E VALORES DE P NA COMPARAÇÃO ENTRE 30 E 120 DIAS.....	34

LISTA DE SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase.

BChE – Butirilcolinesterase.

CA – Teste de Campo Aberto.

ChEs – Colinesterases.

DA – Doença de Alzheimer.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

STZ – Estreptozotocina.

TLO – Teste de Localização de Objeto.

TLY – Teste do Labirinto em Y.

TRO – Teste de reconhecimento de Objeto.

UFPR – Universidade Federal do Paraná.

β A – Beta amiloide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 CONTEXTO DO PROBLEMA.....	12
1.2 OBJETIVOS.....	13
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
1.3 JUSTIFICATIVA.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	15
2.2 COLINESTERASES.....	17
2.3 MODELO ANIMAL.....	18
3 METODOLOGIA.....	21
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.2 GRUPOS SHAM E STZ.....	21
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	23
3.3.1 CAMPO ABERTO (CA).....	23
3.3.2 TESTE DE LOCALIZAÇÃO (TLO) E RECONHECIMENTO DE OBJETO (TRO).....	24
3.3.3 TESTE DO LABIRINTO EM Y (TLY).....	26
3.4 COLETA E HOMOGENIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	27
3.5 MEDIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	27
3.5.1 ATIVIDADE TECIDUAL AChE.....	28
3.5.2 ATIVIDADE TECIDUAL BChE.....	28
3.5.3 ATIVIDADE PLASMÁTICA DA BCHE.....	29
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 COMPARAÇÃO DOS PESOS ENTRE OS GRUPOS SHAM E STZ.....	31
4.2 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ENTRE GRUPOS SHAM E STZ.....	32
4.3 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ENTRE GRUPOS DE 30 E 120 DIAS.....	33
4.4 COMPARAÇÃO ENTRE TECIDOS.....	34
4.5 CORRELAÇÃO ENTRE TIPOS DE AMOSTRAS.....	35

5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERENCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

Com o advento da medicina moderna, houve grande impacto à taxa de vida da população mundial. Com o crescimento da expectativa de vida, a chance de ocorrência de doenças neurodegenerativas, que apresentam o aumento da idade como fator de risco, tem crescimento gradual, tal qual a Doença de Alzheimer (DA) (Stelzmann et al., 1995). A DA, descrita em 1907, é a causa mais comum de demência, sendo responsável por 60-80% de todas as demências, e consiste em um conjunto de distúrbios de causa multifatorial que afetam progressivamente funções relacionadas capacidade de memória, raciocínio claro e pode afetar o rendimento funcional de atividades tidas por complexas. (Corey-Bloom et al., 1995; Abreu et al., 2005; WILLIAMS et al., 2010).

Esta pode vir a se manifestar de duas formas variando na idade de início dos sintomas. Uma delas tida como precoce ou familiar, com herança Mendeliana e ocorre predominantemente em pacientes com menos de 60 anos. A outra é considerada tardia, que ocorre em indivíduos com idade maior que 60 anos, com menor ou nenhuma agregação familiar, de acordo com Bertram (2010). Atualmente, entende-se que a patologia da DA se dá por dois principais mecanismos: pelo acúmulo da proteína β -Amiloide, que resulta na formação de placas proteicas que se depositam entre as células sinápticas, impedindo o fluxo das sinapses neuronais; e condições anormais da proteína tau, envolvendo grande quantidade ou sua forma hiperfosforilada (p-tau), que está relacionada a montagem de microtúbulos e sua disfunção resulta em emaranhados neurofibrilares dentro dos neurônios, impedindo as funções normais da célula (REITZ et al., 2011; Patterson, 2018).

Devido às grandes diferenças de manifestação e progressão da DA nos pacientes, existe a dificuldade no desenvolvimento de tratamentos, sendo assim toda informação a nível genético e ambiental é relevante para predizer o início da doença, prognóstico e abordagem para tratamento (Gauthier et al., 2016).

Uma das principais formas de tratamento para essa condição é o uso de inibidores de colinesterases, o que é associado a uma pequena melhora das condições cognitivas com a diminuição da atividade dessas enzimas, de forma a permitir por mais tempo o sinal transmitido pela acetilcolina nas fendas sinápticas (Casey et al., 2010). Essas colinesterases são responsáveis pela degradação da

acetilcolina (ACh) no organismo, sendo elas a acetilcolinesterase (AChE), relacionada principalmente à regulação da neurotransmissão colinérgica, e a butirilcolinesterase (BChE), mais relacionada aos níveis extracelulares da ACh. (Darreh-Shori et al., 2013; Vijayaraghavan et al., 2016).

Variantes no gene *BCHE* (3q26.1), que codifica para a butirilcolinesterase, são tratados como fatores de risco à DA uma vez que altos níveis de BChE estão relacionado à degradação da ACh, acarretando na ativação das células da glia e a manutenção da mielina para favorecer a formação da placas β A e a neurodegeneração (Reid and Darvesh, 2015).

Com a necessidade de compreensão da doença e a dificuldade de obtenção de amostras biológicas em variadas etapas do desenvolvimento da doença, foi necessário o desenvolvimento de metodologias mais viáveis, utilizando modelos animais para a obtenção de informações para estudo da doença. Já foram padronizadas metodologias que seguem o desenvolvimento da DA do homem em animais usados como modelo. Nesse sentido, comumente são utilizados ratos induzidos ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer por meio da ministração de fármacos (Salkovic-Petrisic, 2013).

Um desses fármacos é a estreptozotocina, que quando injetada por vias cirúrgicas promove o desenvolvimento da doença no animal. Duas vias de desenvolvimento da DA são possíveis com a utilização dessa droga, uma delas ocorre com a inativação de receptores de insulina da região (Grieb et al., 2016) e a outra por meio da promoção de estresse oxidativo, resultando em um processo de neuroinflamação, ocasionando na morte neuronal (Bassani et al., 2017). Com isso, é de grande valor pensarmos no efeito da patologia desenvolvida com a utilização da STZ nas enzimas da via colinérgica, uma vez que essas tendem a apresentar maior atividade em cérebros com a DA se comparados à cérebros saudáveis.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a indução da doença de Alzheimer em modelo animal é associada a mudanças no padrão de atividade das enzimas relacionadas a via colinérgica da doença.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se há diferenças entre os pesos dos grupos SHAM e STZ.
- Comparar as atividades enzimáticas da AChE e BChE, mensuradas a partir de amostras de córtex, hipocampo e fígado, entre ratos controle e ratos modelo da DA induzidos por estreptozotocina.
- Verificar se há diferenças entre as atividades enzimáticas das enzimas entre os ratos eutanasiados com 30 e 120 dias em cada um dos grupos SHAM e STZ.

1.3 JUSTIFICATIVA

Em 2019, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com demência. Sendo a Doença de Alzheimer a responsável pela maior parte das causas de demências, é de grande importância a compreensão das vias que contribuem no desenvolvimento da doença para assim estabelecer tratamentos e métodos para evitar ou retardar o desenvolvimento da doença com mais eficiência (FETER et al., 2021).

As colinesterases presentes no organismo apresentam grande relação com o desenvolvimento da DA uma vez que são as enzimas relacionadas ao metabolismo de neurotransmissores sinápticos e são alvo de drogas utilizadas no tratamento da doença. Maiores informações relacionadas as vias de interação da AChE e BChE com a doença possibilitam maior sucesso em estudos futuros e desenvolvimento de novos medicamentos (Casey et al., 2010 Darreh-Shori et al., 2013; Vijayaraghavan et al., 2016).

A utilização de modelos animais vem com o intuito de viabilizar maior número de estudos e análises acerca do desenvolvimento da doença a nível celular e tecidual, afim de suprir essa necessidade de entendimento da DA devido ao aumento da ocorrência na população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

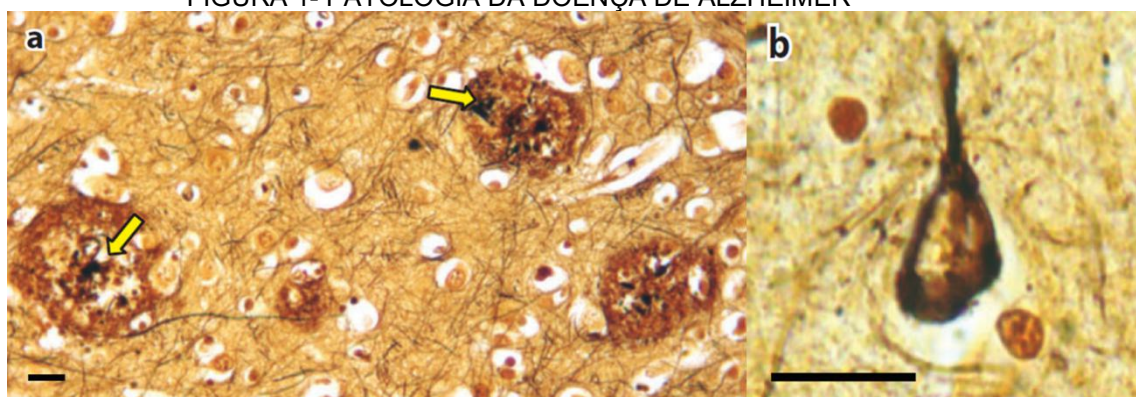
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) consiste em uma demência de efeito neurodegenerativo tida como a mais frequente em populações de idades mais avançadas (Stelzmann et al., 1995). Por demência, tem-se uma síndrome que, com não ocorrência do comprometimento grave do estado de consciência, acarreta em um declínio progressivo das ações cognitivas de forma a interferir nas atividades do indivíduo (Corey-Bloom et al., 1995).

Descrita pelo neurologista alemão Alois Alzheimer no ano de 1907, a DA em seus estados iniciais ocasiona dificuldade no desenvolvimento de um raciocínio claro, além de diminuir o rendimento funcional em atividades complexas. Em quadros mais avançados o paciente pode vir a perder a capacidade de vivência independente e a situação pode ser agravada com o desenvolvimento de sintomas psicóticos ou alterações comportamentais, ocasionando muitas vezes até mesmo desgaste por parte do paciente (Abreu et al., 2005).

Existem duas principais proteínas vinculadas à ocorrência do Alzheimer, a β -Amilóide (β A), encontrada em altos níveis no cérebro de pessoas com a doença, formando placas que se acumulam entre as células sinápticas impedindo a função das mesmas, e a proteína tau que, também em níveis anormais em pessoas acometidas por essa demência, formam emaranhados neurofibrilares dentro dos neurônios, impedindo a ocorrência da sua função sináptica. Além da grande quantidade, a proteína tau quando hiperfosforilada (p-tau) também acarreta no quadro de formação desses emaranhados (REITZ et al., 2011; Patterson, 2018).

FIGURA 1- PATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER



FONTE: Adaptado de O'BRIEN; WONG (2011).

NOTA: Secções do cérebro de um paciente com demência, coradas com prata.

LEGENDA: a) Placas amiloides

b) Emaranhado neurofibrilar.

A doença pode se manifestar nos indivíduos por duas formas distintas, a precoce, familiar ou também conhecida como *early-onset familial AD* (EOFAD), que se manifesta predominantemente em indivíduos com menos de 65 anos, envolvendo um mecanismo de Herança Mendeliana, e a forma tardia, também conhecida como *late-onset AD* (LOAD) que ocorre predominantemente em indivíduos com mais de 65 anos, com menor ou nenhuma agregação familiar (BERTRAM et al., 2010; Bettens et al., 2013). A minoria dos casos decorre de etiologia familiar, sendo regida por herança autossômica dominante. No mecanismo etiológico da doença há maior concentração da proteína β -Amiloide que gera uma cascata de reações decorrentes da DA, devido mutações que ocorrem nos genes codificantes das proteínas APP (Proteína precursora amiloide), *PSEN1* e *PSEN2* (Presinilina 1 e 2, envolvidas nos processos de clivagem da APP utilizando da γ -secretase). Em casos normais, a APP é clivada pela α -secretase, resultando em oligômeros incapazes de se combinar, sendo assim facilmente eliminado, sem a formação de placas. Quando a APP é clivada por β -secretase e em seguida por γ -secretase, gera os peptídeos que se agregam resultando na toxicidade neuronal (Abuznait and Kaddoumi, 2012; Hardy, 2002; Ho, 1998; Nassif et al., 2005; Takahashi et al., 2017; Wang et al., 2017).

O mecanismo da doença envolvido na maior parte dos casos relatados, que são a de manifestação tardia, é pouco esclarecida, contudo, um gene que acredita-se muito envolvido em tal processo é o *APOE*, envolvido na transcrição de uma proteína ligadora de lipídios (Weisgraber et al., 1981). A proteína transcrita apresenta três isoformas correspondentes e três alelos distintos, *APOE2* com menor frequência na população e que confere um fator protetivo para a DA, a *APOE3*, com maior frequência na população, e *APOE4* confere um fator de risco para a doença. Além do gene *APOE*, acredita-se que outros genes podem estar relacionados ao desenvolvimento da DA, tal como os genes *ACHE* e *BCHE*, que codificam as enzimas colinesterases que regulam processos relacionados às sinapses (Darreh-Shori et al., 2013; Jansen et al., 2015; Vijayaraghavan et al., 2016).

Além dos fatores genéticos existem fatores ambientais que influenciam no desenvolvimento da doença de Alzheimer (Tabela 1). Entre eles, podem ser vistos

como fatores de risco o avanço da idade, algumas patologias e maus hábitos. Além desses, alguns fatores podem ser de caráter protetivo ao desenvolvimento da doença, como bons hábitos alimentares e principalmente o estímulo intelectual e físico (Bettens et al., 2013; Reitz and Mayeux, 2014).

TABELA 1 – FATORES DE RISCO E PROTETIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.

Fatores de Risco para o desenvolvimento da DA.		Fatores Protetivos para o desenvolvimento da DA.	
Avanço da idade	Doenças cerebrovasculares	Dieta balanceada	Atividade física
Hipertensão	Diabetes tipo II	Atividade intelectual	Fatores genéticos
Obesidade	Dislipidemia		
Síndrome metabólica	Tabagismo		
Injúrias traumáticas no cérebro	Fatores genéticos		

2.2 COLINESTERASES

As colinesterases (ChEs) consistem em enzimas do grupo das hidrolases presentes nos organismos, responsáveis pela hidrólise de ésteres de colina, desempenham papel chave na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas. Nos vertebrados são presentes duas enzimas atuantes dessa classe, AChE e BChE. A acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) atua principalmente na hidrólise da acetilcolina, resultando em acetato e colina, interrompendo a transmissão dos impulsos nervosos pela rápida hidrólise desse neurotransmissor na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular (PATOCKA et al. 2004). Essa é encontrada na membrana dos eritrócitos, no plasma, sistema nervoso central e junções neuromusculares (JOHNSON; MOORE, 2000; VIJAYARAGHAVAN et al., 2013). A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) tem por preferência de substrato a butirilcolina que, apesar da ausência de uma função fisiológica crítica, está envolvida em diversos processos como hidrólise de acetilcolina e sequestro de peptídeos ricos em prolina (LOCKRIDGE, 2015). Tem ampla distribuição pelo corpo, porém

encontrada em maior quantidade no fígado, onde é sintetizada, e no plasma (DELACOUR et al., 2014; JOHNSON, 2012). Essas proteínas são codificadas, respectivamente, pelos genes *ACHE*, presente no cromossomo 7, e *BCHE*, localizado no braço longo do cromossomo 3 (q26.1-q26.2),

A BChE e a AChE possuem uma homologia de 65% em sua sequência de aminoácidos, e suas estruturas do sítio ativo são bastante semelhantes, embora sejam produtos de genes diferentes (ALLDERDICE et al., 1991). Essa ampla homologia sugere que os genes dessas enzimas (*BCHE* e *ACHE*) possam ter surgido da evolução de um precursor comum (SMALL et al., 1996). Ambas são glicoproteínas (MILLARD & BROOMFIELD, 1992) e possuem um resíduo de aminoácido serina no sítio ativo que é essencial para suas atividades catalíticas, pois realiza a hidrólise do substrato (QUINN, 1987; DARVESH et al. 2003). Ambas as enzimas podem ser relacionadas à doença de Alzheimer, uma vez que apresentam papel fundamental no metabolismo de neurotransmissores e inibidores de colinesterases são umas das principais drogas usadas no tratamento da DA (Bono, et al., 2015).

Na via colinérgica da Doença de Alzheimer, a AChE é predominante na regulação na neurotransmissão colinérgica, enquanto a BChE atua principalmente no controle extracelular desse neurotransmissor, modulando propriedades funcionais das células da glia (Darreh-Shori et al., 2013; Vijayaraghavan et al., 2016). Esse efeito da BChE na via pode ser relacionado com ocorrências da DA devido a diminuição da acetilcolina em circulação quando há atividade exacerbada da enzima, prejudicando a transmissão sináptica, levando à ativação de células da glia e manutenção da mielina favorecendo a formação de placas β A e a neurodegeneração (Ramanan et al., 2014; Reid and Darvesh, 2015).

2.3 MODELO ANIMAL

A utilização de modelos animais em estudos acerca da Doença de Alzheimer começou a ser explorada devido à dificuldade de identificação dos portadores da doença em fases iniciais, uma vez que o paciente começa a demonstrar sintomas em estágio mais avançados. O avanço dessa metodologia permite que sejam avaliados por exemplo: a progressão dos mecanismos da doença, as diferenças na

expressão de genes associados a nível proteico e até mesmo baseado em análises quantitativas de RNA, assim possibilitando também explorar potenciais fatores protetivos à demência estudada (Rostami, 2017).

Um método utilizado para o estudo da DA envolve comumente a aplicação da estreptozotocina (STZ) por injeção intracerebroventricular (ICV) de doses baixas (0,1 a 3 mg/kg) em roedores, tal como ratos Wistar machos entre seu terceiro e quarto mês de vida, com 280 – 350g (KNEZOVIC et al., 2015; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2013; Bassani, 2017) e, mais recentemente, foram realizados estudos utilizando primatas não humanos (PARK et al., 2015; YEO et al., 2015). A STZ, composto derivado de bactérias de solo, desenvolvido inicialmente como um agente anticâncer, passou a ser utilizada para induzir diabetes em experimentos com modelos animais. Desde então a aplicação sistêmica da STZ tornou-se o modelo experimental de diabetes insulino-dependente (tipo 1) mais estudado. Quando injetada nos ventrículos laterais do cérebro de animais, a STZ acarreta em vias muito semelhantes à DA, tal como o estresse oxidativo, neuro inflamação, danos ao sistema colinérgico cerebral, aumento da expressão de tau total/hiperfosforilada e βA , formação de agregados positivos para a proteína βA entre as células, prejuízos no metabolismo energético cerebral e disfunção nos receptores de insulina cerebrais, promovendo déficits cognitivos como prejuízo na memória e orientação espacial. Estudos comumente aplicam esse modelo para o estudo de fatores relacionados à DA, utilizando animais nos seus 10 primeiros dias após a cirurgia. Contudo, não são encontradas muitas informações acerca do método em maior período de tempo. (HOYER et al., 1996; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2006; 2011; AGRAWAL et al., 2009; KRASKA et al., 2012; Grieb, 2016).

Após a cirurgia de aplicação da droga, os animais são mantidos em condições constantes de temperatura, luminosidade e disponibilidade de alimento. No período pós cirúrgico que antecede a eutanásia dos grupos, são realizados testes comportamentais nos indivíduos afim de avaliar o desenvolvimento da DA e da ocorrência de outras manifestações clínicas que possam vir a acontecer devido ao uso da droga (Bassani, 2017; Rostami, 2017).

A utilização desses modelos que utilizam animais são de extrema importância pois viabilizam o estudo da Doença de Alzheimer em diversas etapas do processo patológico, possibilitando e facilitando o uso de recursos biológicos para a realização de estudos propostos.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Polimorfismos e Ligação da Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizado no Departamento de Genética, em parceria com o Departamento de Farmacologia.

Ao todo, foram utilizados inicialmente, 40 animais da espécie *Rattus norvegicus*, Wistar, machos. Os animais foram mantidos em caixas com temperatura, próxima a 25°C, e fornecimento de água e alimento constante, sob um ciclo claro-escuro de 12h, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da UFPR. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética (CEUA/BIO – UFPR – R.O. 08/2020 nº1391)

Com aproximadamente 3 meses, os animais foram designados aleatoriamente para um dos dois grupos: STZ (modelo de DA induzido por streptozotocina) ou SHAM (grupo controle). As cirurgias nos ratos utilizados foram realizadas entre os dias 11 e 16 de março de 2021. Após o procedimento, 10% dos animais não sobreviveu, sendo que ao final do experimento o grupo STZ contou com 22 animais e o grupo SHAM com 14 animais.

Afim de desempenhar um acompanhamento da saúde e desenvolvimento dos animais, esses foram pesados, semanalmente até os 30 primeiros dias após a cirurgia, e após a cirurgia a mensuração se deu em intervalos maiores até o fim do experimento.

Ao todo, o experimento durou 120 dias.

3.2 GRUPOS SHAM E STZ

Todos os animais passaram por um procedimento cirúrgico, porém, o grupo submetido ao efeito da estreptozotocina (grupo STZ) recebeu injeção bilateral de STZ nos ventrículos laterais (3 mg/kg de peso corporal em solução salina estéril; total de 0,9 mg de STZ em 9 µL, divididos em 4,5 µl por local de injeção) (ISHRAT et al., 2009; KRASKA et al., 2012), enquanto o grupo controle (grupo SHAM), passou pelo mesmo procedimento cirúrgico, mas teve o mesmo volume injetado apenas com uma solução salina.

A cirurgia de infusão da STZ nos animais foi realizada após a aplicação de 1ml de equitesin e 0,3 ml de hidrato de cloral, promovendo a sedação dos animais, e 0,4ml de atropina, afim de inibir as secreções e ressecar as vias respiratórias e as mucosas, reduzindo também a secreção gástrica. Após a sedação do animal, o rato foi posicionado em um aparelho estereotáxico (David Kopf, modelo 957L, EUA) e o crânio foi exposto com bisturi. Foram ajustadas as seguintes coordenadas estereotáxicas para os ventrículos laterais relativas ao bregma: ântero-posterior, -0,8 mm; mediolateral, $\pm 1,5$ mm a partir da linha média; e dorso-ventral, -3,8 mm a partir da superfície do crânio, segundo PAXINOS et al. (1997) (Figura 2). Com o animal posicionado, foram realizadas pequenas perfurações viabilizando o processo de microinfusão, realizada utilizando uma agulha conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa de 10 μ l (Hamilton, EUA) que foi encaixada em uma bomba de infusão (Insight, Brasil).

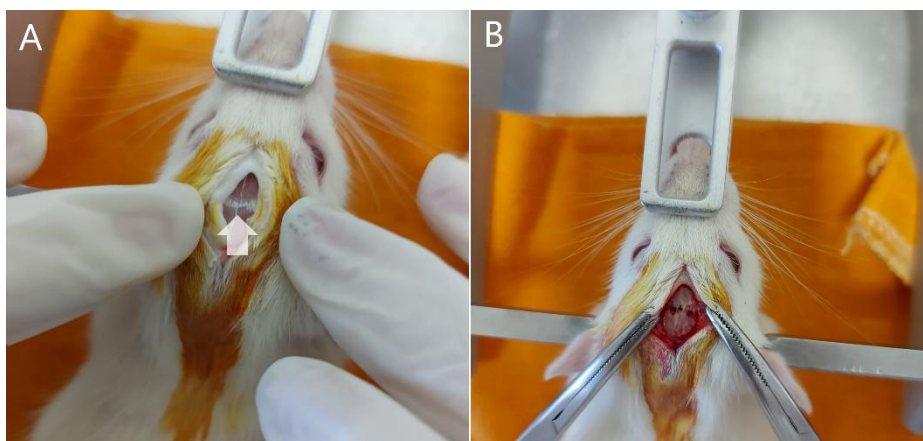
A STZ foi dissolvida em solução salina estéril e gelada, protegida da luz e mantida em gelo até o momento da infusão para evitar a sua degradação. As microinfusões de toxina foram realizadas com fluxo de 1 μ l/minuto ao longo de 4,5 minuto, mais dois minutos de espera antes de retirar a agulha, após o fim da infusão, para evitar refluxo da droga.

O mesmo método foi utilizado para os animais do grupo SHAM, contudo, ao invés da injeção da estreptozotocina, foi injetada apenas solução salina

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente aquecido por 2-4 h para recuperação da anestesia.

Uma parte dos animais de ambos os grupos foi eutanasiada com 30 dias após a cirurgia e outra parte foi eutanasiada após 120 dias, a fim de avaliar as reações teciduais em maior e menor tempo de atuação da droga.

FIGURA 2 – EXPOSIÇÃO E PERFURAÇÕES DO CRÂNIO



FONTE: O autor, 2021.

LEGENDA: A) Exposição do crânio com indicação do bregma.

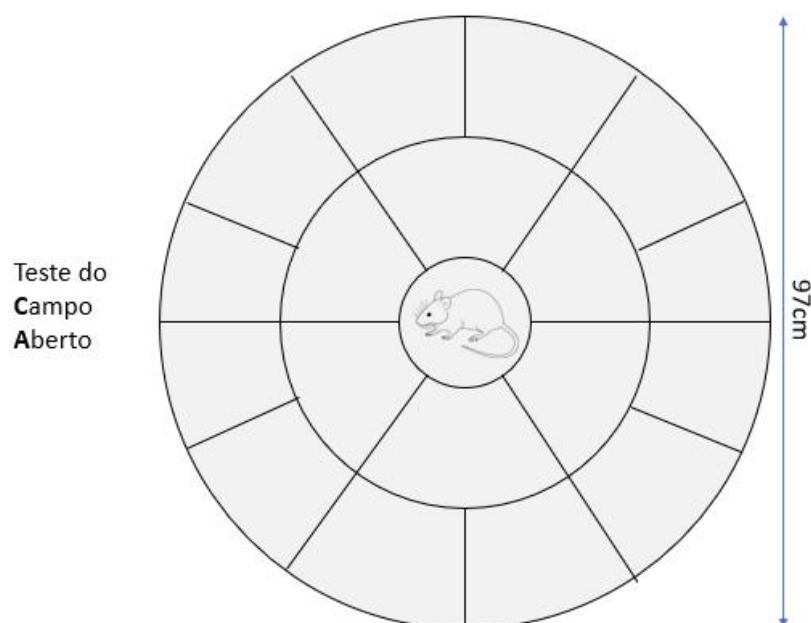
B) Perfurações no crânio.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (CA)

O teste de campo aberto foi realizado 21 dias após o procedimento cirúrgico dos animais e teve como objetivo avaliar a atividade locomotora e exploratória espontânea dos animais. Para a realização do teste foi utilizada uma arena circular com 97 cm de diâmetro e 42 cm de altura, pintada em branco, dividida com linha pretas em 3 círculos concêntricos e subdividida em 19 quadrantes. Os animais foram colocados no centro da arena e filmados por cinco minutos, de forma a avaliar posteriormente o número de vezes que o animal mudou de quadrante (quando ele passa com as quatro patas para outro quadrante) e o número de vezes que o mesmo levantou (quando o animal se apoia somente sobre as patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena). Após cada animal, a arena foi limpa com álcool 10% para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciassem no comportamento dos próximos.

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DO TESTE DO CA.



LEGENDA – Representação da arena utilizada para a realização do teste do Campo Aberto.

3.3.2 TESTE DE LOCALIZAÇÃO (TLO) E RECONHECIMENTO DE OBJETO (TRO)

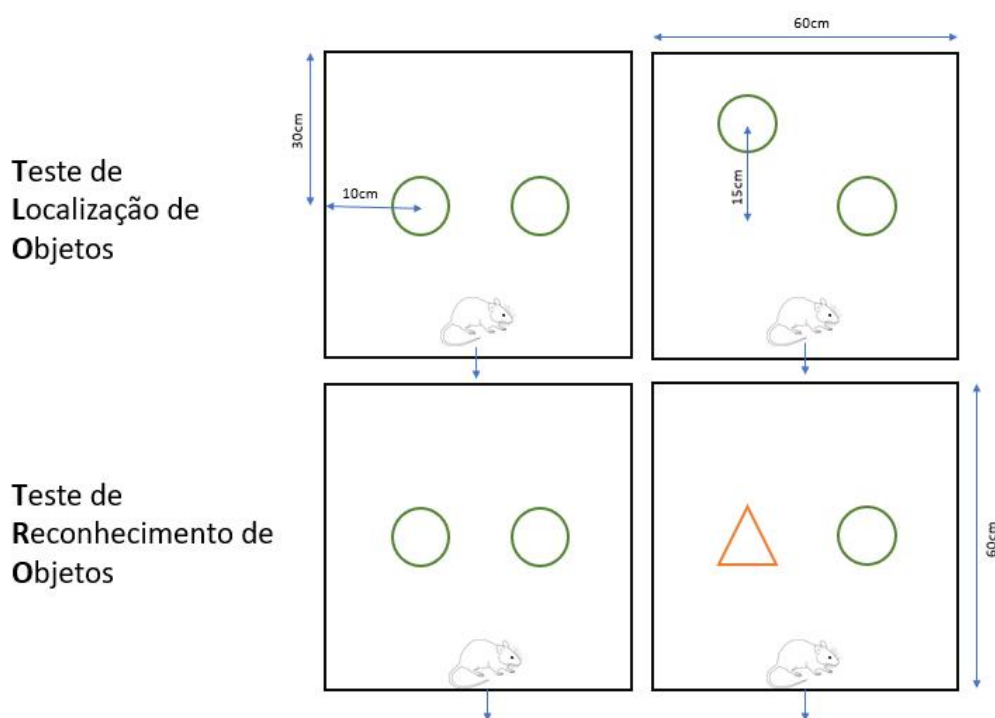
Os testes de localização e reconhecimento de objetos foram realizados na semana anterior à eutanásia dos animais e tiveram como objetivo a avaliação da memória espacial e de reconhecimento de curto prazo. Ambos os testes foram executados em uma caixa quadrada (60 x 60 x 40 cm), confeccionada em madeira, pintada de preto. Esses testes foram realizados no decorrer de três dias consecutivos. No primeiro dia foi realizada a habituação dos animais na caixa ainda vazia. Cada animal foi deixado por 5 minutos na caixa, sendo colocados nela sempre voltados para parede, para livre exploração. No segundo dia a primeira etapa consistiu em um reforço da ambientação, também por 5 minutos na caixa vazia. Após 1h de intervalo, para a segunda etapa os objetos foram colocados com aproximadamente 10cm de distância das paredes e os animais puderam explorar por 5 minutos. Na última etapa, o teste de localização dos objetos, 1h depois do reconhecimento dos objetos pelos animais, um dos objetos foi deslocado 15cm em relação a posição original e os animais foram novamente colocados um a um na caixa para explorar os objetos por 3 minutos. Essa última etapa foi gravada para

posteiros comparação do tempo que o animal explorou o objeto movido com o tempo de exploração do objeto que permaneceu em sua posição original (DE BRUIN et al., 2011).

No terceiro dia foi realizado o teste de reconhecimento de objeto, que constitui em duas etapas. A primeira, em que foram colocados os mesmos objetos utilizados no dia anterior, localizados a 10cm das paredes, e os animais tiveram 5 minutos para explorá-los e a segunda etapa, em que houve a troca de um dos objetos originais por outro diferente e os animais tiveram 3 minutos para explorar os objetos. A segunda etapa desse teste foi realizada 1h após a primeira e filmada para posterior comparação do tempo que o animal explorou o objeto novo com o tempo de exploração do objeto original.

A caixa e os objetos foram higienizados com álcool 10% todas as vezes que um animal era colocado para a realização dos testes. Os objetos eram confeccionados em plástico e cerâmica, a fim de evitar viés olfatório.

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DO TLO E TRO.



LEGENDA: Arena de realização dos testes de localização e reconhecimento de objeto, com um círculo representando o objeto inicial e um triângulo representando o objeto novo.

3.4 COLETA E HOMOGENIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os animais foram eutanasiados em guilhotina sem anestesia prévia para evitar mudanças nos padrões bioquímicos das enzimas estudadas. Imediatamente após a eutanásia dos animais, foi coletado sangue em tubos com anticoagulante, para garantir o bom estado do material para a análise de atividade enzimática e foi realizada a dissecação do animal, retirando amostras de fígado, região onde ocorre a síntese da butirilcolinesterase, córtex e hipocampo cerebral, regiões relacionadas a memória, orientação espacial e onde são encontrados neurônios colinérgicos (WEINSTOCK; SHOHAM, 2004; HANDSON et al. 2011). Os microtubos, previamente pesados, foram utilizados para guardar as amostras e foram mantidos em gelo, até o armazenamento em freezer a -80°C ao fim do procedimento.

Em laboratório, os microtubos com o material foram novamente pesados em balança de precisão para que, com a subtração do valor obtido da pesagem anterior do microtubo, fosse calculado o peso do material obtido. Após a pesagem, foi adicionado 10x o volume do tecido de Tampão fosfato (0,1M - pH 7,1) + Triton X (1%) e, com auxílio de um homogeneizador elétrico, o tecido foi misturado até que não restasse grumos. A porção que entra em contato com o tecido do homogeneizador é lavada a cada amostra processada com álcool 70%, hipoclorito 2% e água destilada. Após a homogeneização o material foi submetido a centrifugação por 15 minutos, a 10.000 rpm e 4°C , o sobrenadante resultante da centrifugação foi passado para outro tubo e o pellet formado, descartado. O sobrenadante do material homogeneizado permaneceu sendo mantido a -80°C .

3.5 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Todas as leituras foram realizadas na Multileitora Infinite M200 TECAN, a 25°C , com tempo e número de leituras respeitando cada protocolo.

Após o cálculo da variação da absorbância por minuto ($\Delta E/\text{min}$) de cada amostra, o valor foi multiplicado pelos respectivos valores calculados a partir de cada protocolo utilizado, afim de obter o valor relativo à atividade das enzimas em Unidades/min (U/min), baseado no método de Ellman (1961).

$$U/ml = \frac{X \cdot Y \cdot \Delta E/min}{13,6 \cdot Z}$$

X= Volume total no poço, em mL.

Y= Fator de diluição.

Z= Volume de amostra diluída.

3.5.1 ATIVIDADE TECIDUAL DA AChE

Para medição da atividade enzimática da AChE foi utilizada a Etopropazina, reagente que tem como função a inibição da atividade da BChE no tecido estudado durante a leitura realizada por um equipamento, uma vez que essa também atua na decomposição da acetilcolina.

Em uma placa ELISA, 96 poços de fundo reto, foi adicionado previamente 170µl de tampão fosfato com DTNB, 10µl de etopropazina e 10µl da amostra solubilizada. Após a aplicação dos reagentes a placa foi mantida em estufa a 37°C por 10 minutos para a atuação da etopropazina.

Após a incubação em 37°C, necessariamente antes de colocar a placa no leitor, adicionamos 10 µl do Iodeto de Acetilcolina (ACh) para que esse atue como substrato para a AChE presente na amostra, assim desencadeando uma reação que resulta em compostos pigmentados sensíveis ao leitor para mensurar a reação. A leitura foi realizada no aparelho TECAN®, espectrofotômetro com leitor de microplaca, a temperatura de 25°C, configuração de 5 ciclos com intervalo de um minuto, 410 nm de absorbância e quatro leituras nas extremidades de cada poço. O resultado da leitura foi mostrado em uma tabela. Para analisar foi calculado as diferenças dos valores da absorbância entre os quatro ciclos.

3.5.2 ATIVIDADE TECIDUAL DA BChE

A metodologia de obtenção da atividade enzimática da BChE foi baseada na hidrólise da propioniltiocolina pela BChE, que produz ácido propiônico e tiocolina, a

qual reage com DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato, substância de coloração amarela.

Para a mensuração da atividade foi utilizada uma placa de ELISA com 96 poços. Na placa de leitura, foi adicionado 100 µL do tampão fosfato com DTNB e 15 µL da amostra. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas. O substrato foi adicionado em cada amostra no momento em que foi realizada a leitura, para que não houvessem alterações nos resultados devido a rápida reação que ocorre com o substrato. Foram utilizados 10 µL de propioniltiocolina como substrato em cada poço.

A leitura foi feita no aparelho TECAN®, espectrofotômetro com leitor de microplaca, a temperatura de 25°C, configuração de 4 ciclos com intervalo de um minuto, 410 nm de absorbância e quatro leituras em cada poço (nas extremidades). O resultado da leitura é mostrado em uma tabela. Para analisar é necessário calcular as diferenças dos valores da absorbância entre os quatro ciclos.

3.5.3 ATIVIDADE PLASMÁTICA DA BCHE

A atividade enzimática da BCHE no plasma sanguíneo foi obtida segundo a metodologia de Dietz et al. (1972), modificada por Evans e Wroe (1978). Essa metodologia se baseia na hidrólise da propioniltiocolina pela BCHE, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato, substância de coloração amarela.

Para a mensuração da atividade foi utilizada uma placa de ELISA com 96 poços onde o plasma sanguíneo foi misturado à água destilada na proporção de 1:10 (10 µL de plasma em 100 µL de água). Na placa de leitura, adicionou-se 220 µL do tampão fosfato com DTNB e acrescentou-se 25 µL da amostra diluída. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas. O substrato foi adicionado nos poços imediatamente antes de colocar a placa no equipamento para realizar a leitura, para que não existam alterações nos resultados devido a rápida reação que ocorre com o substrato. Foram utilizados 10 µL de propioniltiocolina como substrato em cada poço.

A leitura foi feita no aparelho TECAN®, espectrofotômetro com leitor de microplaca, a temperatura de 25°C, configuração de 4 ciclos com intervalo de um minuto, 410 nm de absorbância e quatro leituras em cada poço (nas extremidades). O resultado da leitura é mostrado em uma tabela. Para a análise, é necessário calcular as diferenças dos valores da absorbância entre os quatro ciclos.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas em software R x64 4.1.1. Primeiramente foi testada a normalidade e variância dos dados quantitativos, aplicando o teste de Kolmogorov com correção de Lilliefors e teste F, respectivamente (pacote Nortest). A comparação das médias entre os grupos SHAM e STZ foi realizada aplicando o Teste t de Student pareado (para as variáveis paramétricas) e o teste de Wilcoxon (para as variáveis não paramétricas). A comparação das médias entre os grupos de 30 e 120 dias foi igualmente realizada. Foi adotado o limiar de significância de $p=0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 COMPARAÇÃO DOS PESOS ENTRE OS GRUPOS SHAM E STZ

Foi observado na primeira semana após a cirurgia, entre o T1 e o T2, no grupo SHAM, estabilidade no peso dos animais, enquanto no grupo STZ é notada uma queda na média dos pesos (Figura 6) ocasionando uma diferença entre as médias dos grupos SHAM e STZ. Essa diferença entre os grupos se manteve significativa até o último dia de pesagem, próximo ao dia da eutanásia dos animais do grupo de 120 dias, de forma que os animais de ambos os grupos ganharam peso no decorrer do tempo, mas o grupo STZ teve, em média, pesos menores. (Tabela 2).

FIGURA 6 – GRÁFICO COMPARATIVO DOS PESOS MÉDIOS DOS GRUPOS SHAM E STZ.

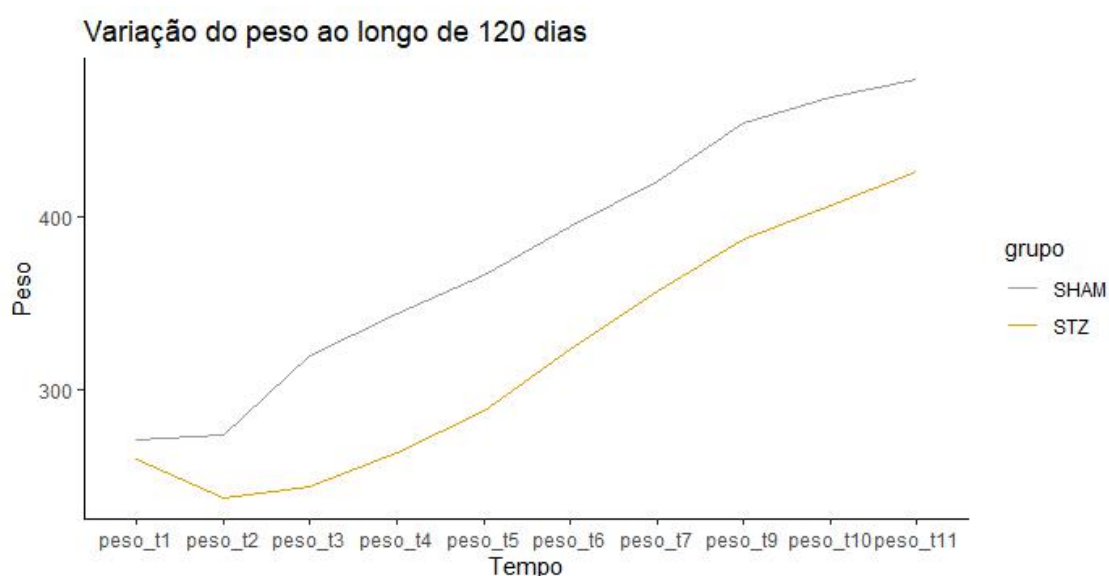


TABELA 2 – VALORES DE P RELATIVOS À COMPARAÇÃO DOS PESOS MÉDIOS ENTRE OS GRUPOS SHAM E STZ EUTANASIADOS COM 30 E 120 DIAS.

Tempo de eutanásia			Tempo de Eutanásia		
Tempo	30 dias	120 dias	Tempo	30 dias	120 dias
1	0,97009633	0,206363	6	0,00053846	1,5396E-06
2	0,19332157	0,00059277	7	-	8,8794E-07
3	2,607E-05	3,9451E-06	8	-	1,6327E-06
4	5,4176E-05	1,4007E-07	9	-	1,7306E-05
5	3,2957E-05	6,71694E-07	10	-	0,00023996

TABELA 3 – DATAS DAS PESAGENS DOS ANIMAIS

Tempo	Data	Tempo	Data
1	10/03/21	6	16/04/21
2	16/03/21	7	28/04/21
3	24/03/21	9	28/05/21
4	31/03/21	10	14/06/21
5	07/04/21	11	02/06/21

NOTA: As cirurgias dos animais ocorreram: grupo de 120 dias – 11 e 12 de março.
grupo de 30 dias – 15 e 16 de março.

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

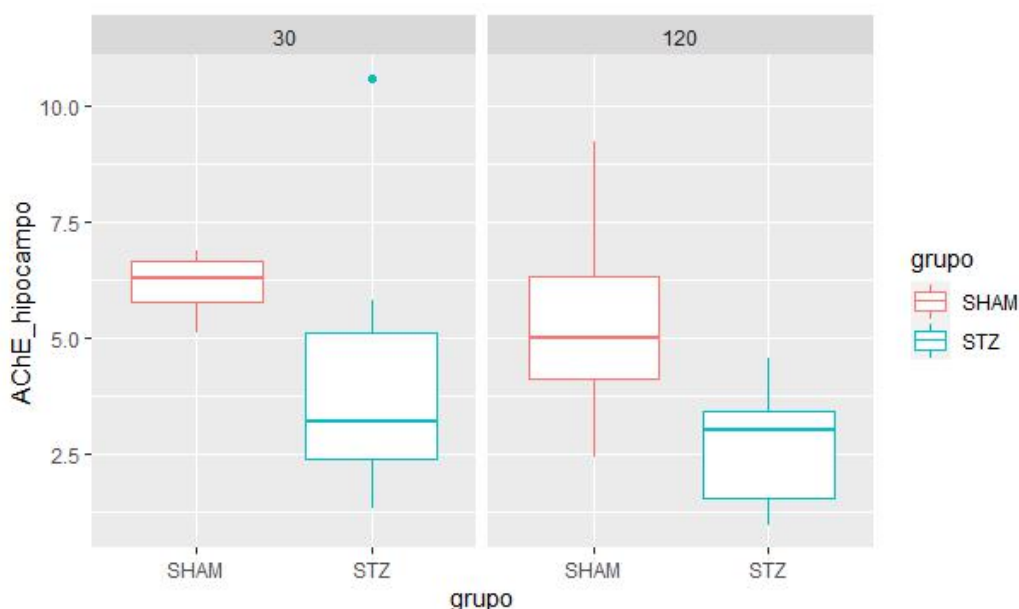
Os testes comportamentais foram filmados para que posteriormente fossem analisados. No teste de campo aberto, foram contabilizados o número de vezes que os animais trocaram de quadrante e o número de vezes em que ficaram apoiados apenas nas duas patas traseiras afim de verificar a ocorrência de algum tipo de lesão decorrente da cirurgia nos animais capaz de afetar a capacidade motora. Nesse teste não foram observadas nenhum animal aparentemente incapaz de se locomover e não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos analisados.

Ao comparar os resultados obtidos dos grupos SHAM e STZ, foi observada uma diferença significativa no índice de exploração no TLO nos animais de 30 dias ($p=0.00032$), em que houve menor exploração pelos animais do grupo STZ do objeto movido. Foi encontrada também diferença entre o grupo SHAM e STZ no TRO nos animais de 30 dias, em que o grupo STZ demonstrou valores menores nos índices de discriminação (0.001653) e exploração (0.000198). Na análise comparativa entre os grupos de 30 e 120 dias, foram encontradas diferenças no índice de exploração no TLO ($p=0.01505$), em que o grupo de 120 dias STZ apresentou valor maior no teste (0.21) se comparado ao de 30 (0.13), e no tempo no braço fechado no TLY ($p=0.03568$), em que os animais do grupo de 120 dias apresentaram tempo maior (45.55s e 33.16s) no braço não explorado previamente.

4.3 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ENTRE GRUPOS SHAM E STZ

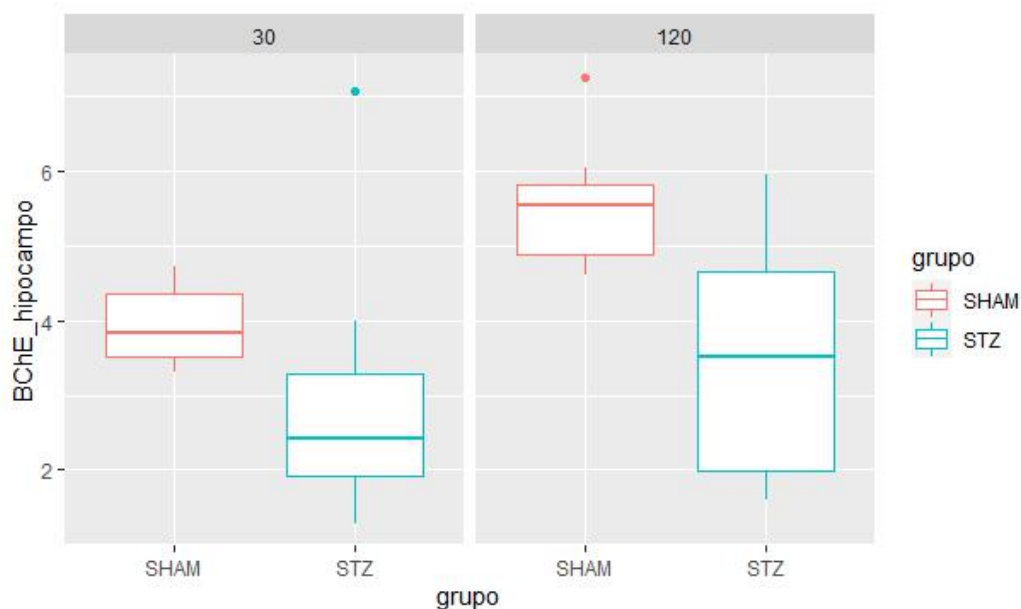
A atividade da AChE no córtex foi semelhante entre os animais SHAM e STZ no grupo de animais de 30 dias ($p = 0,7936$) e no de 120 dias ($0,6107$). Isso ocorreu também no fígado em animais de 30 ($0,4918$) e 120 dias ($0,4409$). Contudo, ao analisarmos as amostras de hipocampo foi observado que a AChE apresentou menor atividade no grupo STZ quando comparado ao grupo SHAM ($p=0,0256$) nos animais eutanasiados 30 dias após a cirurgia, e também nos de 120 dias ($p = 0,0030$) (figura 7).

FIGURA 7 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AChE NO HIPOCAMPO.



Na análise da BChE, as atividades enzimáticas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos SHAM e STZ em amostras de córtex ($p = 0,3855$ e $0,7712$), fígado ($p = 0,5316$ e $0,2218$) e de plasma ($p = 0,1112$ e $0,4824$), nos grupos de 30 e 120 dias. Nas amostras de hipocampo, o grupo de 30 dias, apesar de não apresentar diferença significativa (SHAM com $3,9474$ e STZ com $2,8744$), foi próxima a significância ($p = 0,0628$). Contudo, no grupo de 120 dias é notada diferença entre as atividades dos grupos ($p = 0,0083$), em que a atividade do grupo STZ é novamente menor que no grupo SHAM (médias de atividade da BChE $5,5431$ e $3,4320$, figura 8).

FIGURA 8 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE NO HIPOCAMPO.



4.4 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ENTRE GRUPOS DE 30 E 120 DIAS

Na comparação entre os grupos de animais que foram eutanasiados com 30 e 120 dias, foi possível notar que o grupo submetido à indução da droga (STZ) apresentou diferenças significativas no córtex, na atividade da AChE e BChE, com atividade das enzimas menores no grupo de 120 dias. Foram notadas também atividades menores no grupo de 120 dias na atividade da BChE no plasma. No grupo STZ, a atividade da AChE também apresentou uma diferença significativa no fígado, contudo, a média menor das atividades é vista em 30 dias. No grupo SHAM, apenas na análise da BChE do hipocampo e fígado apresentaram uma diferença significativa, em ambos os casos apresentando médias maiores no grupo de 120 dias (Tabela 3).

TABELA 4 – MÉDIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E VALORES DE P NA COMPARAÇÃO ENTRE 30 E 120 DIAS.

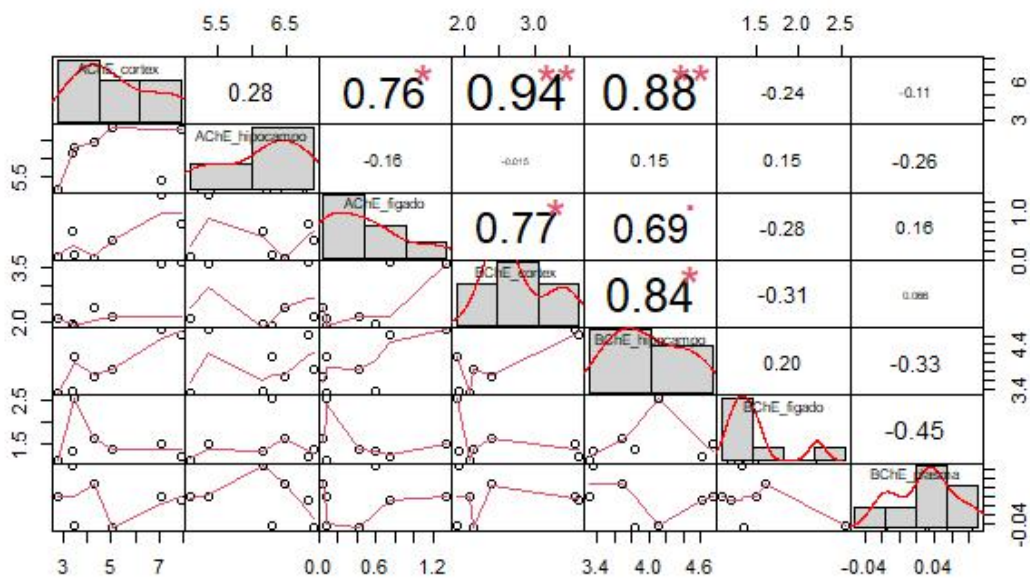
<i>Grupo</i>	<i>Tecido</i>	<i>Enzima</i>	<i>30 dias</i>	<i>120 dias</i>	<i>Valor de p</i>
<i>STZ</i>	Córtex	AChE	4,6577	3,5087	0,0239*
		BChE	2,8169	2,1813	0,0105*
	Hipocampo	AChE	4,0471	2,5891	0,1147
		BChE	2,8744	3,4320	0,4369
	Fígado	AChE	0,3383	0,5658	0,0105*
		BChE	1,6583	1,8617	0,5395
	Plasma	BChE	0,6152	0,0448	0,0071*
<i>SHAM</i>	Córtex	AChE	4,8517	2,5205	0,2796
		BChE	3,8082	2,3640	0,8113
	Hipocampo	AChE	6,1597	5,3655	0,3934
		BChE	3,9474	5,5431	0,0028*
	Fígado	AChE	0,4748	0,6074	0,6088
		BChE	1,5178	2,4117	0,0175*

Nota: Valores de p significativos foram marcados com ***.

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE TIPOS DE AMOSTRAS

Ao testar as correlações entre os tecidos e o plasma nos grupos SHAM e STZ com 30 e 120 dias foi possível notar que, nos grupos SHAM de 30 e 120 dias é encontrado maior número de correlação entre os tecidos, plasma e enzimas quando comparado aos animais de 30 e 120 dias do grupo STZ (Figuras 9 e 10).

FIGURA 9 – CORRELAÇÃO DAS ATIVIDADES DA BChE E AChE NO O GRUPO SHAM COM 30 DIAS.



NOTA: Os valores mostrados na tabela são relacionados ao coeficiente de correlação e tem o grau de significância marcado por * em maior (maior coef. de correlação) ou menor número (menor coef. de correlação) afim de facilitar a visualização dos dados.

FIGURA 10 – CORRELAÇÃO DAS ATIVIDADES DA BChE E AChE NO O GRUPO SHAM COM 120 DIAS.

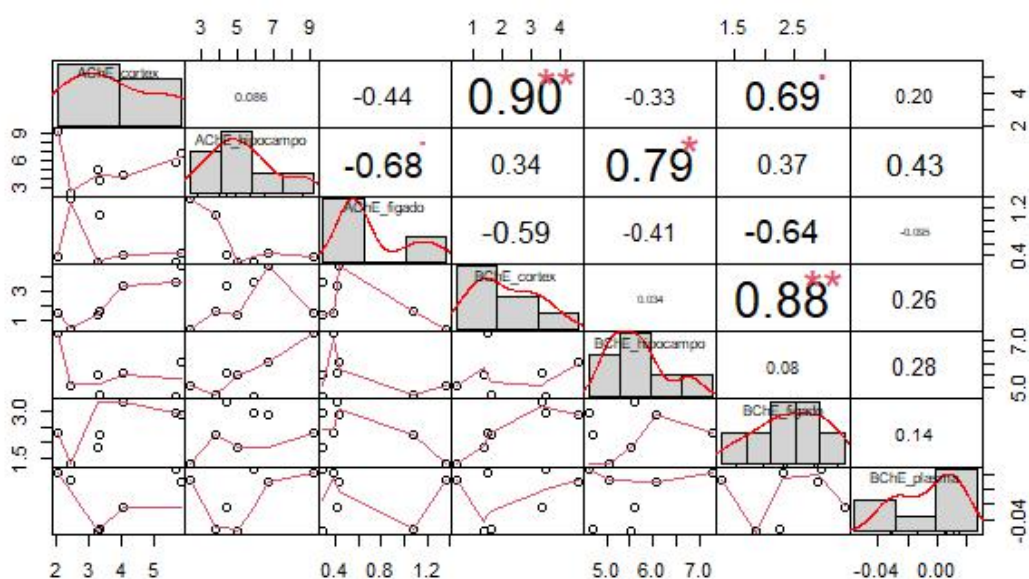
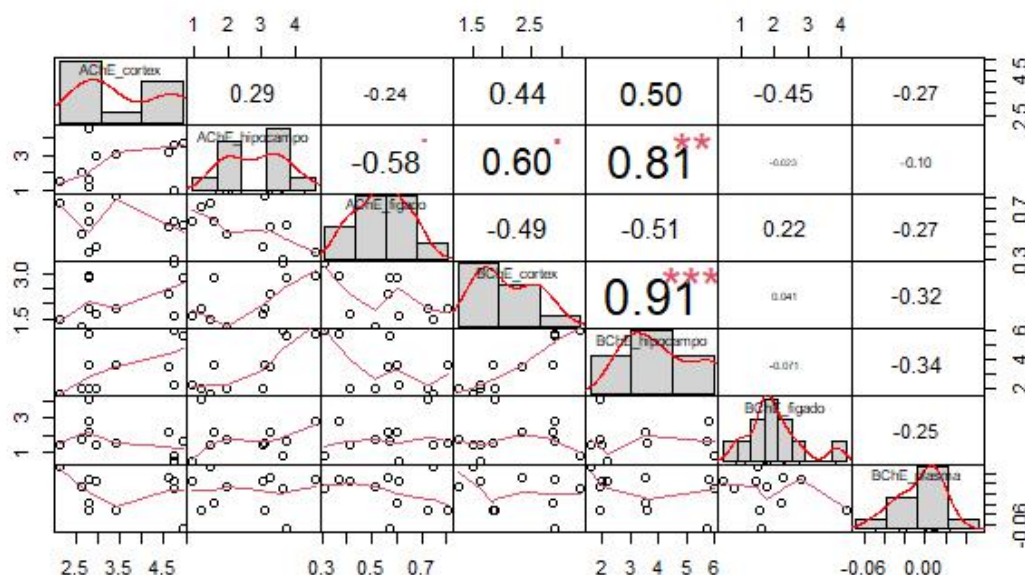


FIGURA 12 – CORRELAÇÃO DAS ATIVIDADES DA BChE E AChE NO O GRUPO STZ COM 120 DIAS.



5 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos com a análise do teste de Campo Aberto, podemos notar que os animais não apresentaram problemas oriundos da cirurgia que afetassem a locomoção para a realização dos demais testes. Nos testes comportamentais, o grupo de animais STZ de 30 dias apresentou um declínio cognitivo similar ao desenvolvido na Doença de Alzheimer, uma vez que esses animais apresentaram valores menores no índice de exploração no TLO e no TRO, de forma a mostrar que esses animais exploraram de forma similar o objeto original e o objeto movido ou trocado. Isso está relacionado a uma perda da memória de curto prazo, uma vez que o esperado para animais saudáveis é que com a ambientação, esses tivessem uma lembrança de como é o objeto não alterado e explorassem mais o objeto novo ou movido (DE BRUIN et al., 2011). Com a análise comparativa entre os grupos STZ de 30 e 120 dias, a estreptozotocina mostrou surtir efeito maior nos primeiros 30 dias do animal, se comparados aos de 120 dias.

A injeção da STZ, além de desempenhar determinada influência no comportamento cognitivo dos animais, ela também afetou negativamente o

crescimento dos animais submetidos à droga. O percentual de óbito dos animais, em função do procedimento cirúrgico, provavelmente foi associado a diferença de reação e sensibilidade do organismo com a quantidade utilizada de anestésico.

Ao tratarmos da atividade das enzimas, uma vez que as diferenças na comparação entre os grupos SHAM e STZ são vistas apenas no hipocampo, notamos que a droga utilizada apresenta efeito maior na atividade das colinesterases somente região do cérebro. Nessa mesma análise, a menor atividade encontrada no grupo STZ nos tempos analisados pode ser explicada como uma forma de compensação do organismo a reestabelecer as condições normais após a injeção da droga.

Um estudo que buscou compreender os efeitos do uso da estreptozotocina em modelo animal relata o funcionamento da droga em três fases, sendo a primeira correspondente a uma resposta aguda à STZ, seguida de um período próximo ao 1º e 3º mês após a injeção em que há uma tendência de o organismo tentar reestabelecer as suas condições normais e um terceiro período em que há um agravamento lento e progressivo das alterações ocasionadas pela injeção, ao longo de 6 a 9 meses (Grieb, 2016).

Dessa forma, é possível relacionarmos os resultados obtidos nos testes comportamentais e as médias dos animais eutanasiados com 30 e 120 dias com a segunda fase de atuação da droga relatada por Grieb, uma vez que a baixa atividade da AChE e BChE no hipocampo em 30 dias e 120 dias, do grupo STZ, pode ser uma tentativa do organismo do animal de amenizar os efeitos da droga. Uma vez que, as colinesterases tem como função o metabolismo da acetilcolina nas vias sinápticas, a alta atividade da AChE e BChE está relacionada ao menor tempo de atuação desse neurotransmissor nas células. Nessa via anormal promovida pelo uso da estreptozotocina nos ratos, em que há o desenvolvimento de uma patologia que dificulta as vias sinápticas, a diminuição das colinesterases é tida como uma alternativa metabólica para amenizar os dados promovidos pela droga (Darreh-Shori et al., 2013; Vijayaraghavan et al., 2016).

Essa ideia é ainda corroborada com a comparação da atividade das enzimas nos grupos de animais de 30 e 120 dias. O aumento da atividade da BChE observado no hipocampo e no fígado nos animais do grupo SHAM pode ser relacionado ao processo natural relacionado ao envelhecimento. Contudo, a diminuição da atividade com avançar do tempo no grupo STZ, no caso da AChE e

BChE no córtex e da BChE no plasma, pode ser relacionada a ideia do período de tentativa de compensação dos efeitos da droga no organismo a médio prazo.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo serviu para a melhor compreensão dos efeitos da estreptozotocina utilizando ratos Wistar como modelo, principalmente em relação ao tempo de efeito, de forma a notarmos maior influência em animais de 30 dias, se comparados a animais de 120 dias.

Foram notadas alterações ocasionadas pela injeção intraventricular da droga nas funções cognitivas dos animais, que vieram a ser testadas pela aplicação dos testes comportamentais de campo aberto, reconhecimento de objeto, localização de objeto e labirinto em Y.

A dose utilizada de estreptozotocina claramente afetou o desenvolvimento corporal dos animais, devido as diferenças de peso encontradas nos animais do grupo SHAM e STZ.

No modelo aplicado para o estudo da doença de Alzheimer, as atividades das enzimas AChE e BChE foram afetadas, principalmente na região do hipocampo cerebral, em que houve diminuição das mesmas, possivelmente devido a uma tentativa de uma via compensatória aos efeitos da droga, diminuindo a atividade das enzimas afim de estabilizar o sinal promovido pela acetilcolina nas vias sinápticas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. D.; FORLENZA, O. V.; BARROS, H. L.; **Demência de Alzheimer: correlação entre memória e autonomia.** Rev. psiquiatr. clín., São Paulo, v. 32, n. 3, p. 131-136, June 2005.
- ABUZNAIT, A.H., KADDOUMI, A., 2012. **Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer' s Disease**, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Louisiana at.
- ALLDERDICE, P.W.; GARNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N., MCALPINES, J. **The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromossome site, 3q26.** Genomics, San Diego, v.11, n.2, p.452-454, 1991.
- BASSANI, T.B.; BONATO, J.M.; MACHADO, M.M.; CÓPPOLA-SEGOVIA, V.; MOURA, E.L.; ZANATA, S.M; et al., 2017. **Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type.** Behavioural Brain Research, 335. 10.1016/j.bbr.2017.08.014.
- BASSANI, T.B.; BONATO, J.M.; MACHADO, M.M.; CÓPPOLA-SEGOVIA, V.; MOURA, E.L.; ZANATA, S.M; 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. (2017) 1–17.
- BETTENS, K., SLEEGERS, K., VAN BROECKHOVEN, C., 2013. **Genetic insights in Alzheimer's disease.** Lancet Neurol. 12, 92–104. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70259-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70259-4)
- BONO, G.F., SIMÃO-SILVA, D.P., BATISTELA, M.S., JOSVIK, N.D., DIAS, P.F.R., NASCIMENTO, G.A., SOUZA, R.L.R., PIOVEZAN, M.R., SOUZA, R.K.M., FURTADO-ALLE, L., 2015. **Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity,**

molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Neurochem. Int.* 81, 57–62.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.12.009>

BERTRAM, L.; LILL, C. M.; TANZI, R. E. **The genetics of Alzheimer disease: back to the future.** *Neuron*, v. 68, p. 270–281, 2010.

COREY-BLOOM, J.; THAL, L.; GALASKO, D.; FOLSTEIN, M.; DRACHMAN, D.; RASKIND, M.; LANSKA, D.J. - **Diagnosis and evaluation of dementia.** *Neurology* 1995;45:211-8, 1995.

DARREH-SHORI, T., VIJAYARAGHAVAN, S., AEINEHBAND, S., PIEHL, F., LINDBLOM, R.P.F., NILSSON, B., EKDAHL, K.N., LANGSTROM, B., ALMKVIST, O., NORDBERG, A., 2013. **Functional variability in butyrylcholinesterase activity regulates intrathecal cytokine and astroglial biomarker profiles in patients with Alzheimer's disease.** *Neurobiol. Aging* 34, 2465–2481.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.027>

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. **Neurobiology of butyrylcholinesterase.**
Nature Reviews. Neuroscience, Londres, v.4, n.2, p.131-138, 2003.

DE BRUIN, N. M. W. J. et al. **Two novel 5-HT₆ receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats.** *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 96, n. 2, p. 392–402, 2011.

DELACOUR, H. et al. **Characterization of a novel butyrylcholinesterase point mutation (p . Ala34Val), “silent” with mivacurium.** *Biochemical Pharmacology*, v. 92, n. 3, p. 476–483, 2014.

DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. e HODGES, L.K. **Improved method for the differentiation of cholinesterase variants.** *Am. J. Genet.*, v. 24, p.58-64, 1972.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., & FEATHERSTONE, R. M. (1961). **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9

GRIEB, P. **Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism.** *Mol Neurobiol* 53, 1741–1752 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>

FETER, N.; et al., **Physical activity attenuates the risk for dementia associated with aging in older adults with mild cognitive impairment.** Findings from a population-based cohort study, *Journal of Psychiatric Research*, Volume 141, 2021, Pages 1-8, ISSN 0022-3956, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.06.034>.

HANDSON, N.D.; OWENS, M.J.; NEMEROFF, C.B.; **Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal,** *Neuropsychopharmacology* 36 (2011) 2589–2602, <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2011.220>.

HARDY, J., 2002. **The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics.** *Science* 297, 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>

HO, C., 1998. **Possible Causes of Alzheimer's Disease: Amyloid Fragments, Free Radicals, and Calcium Homeostasis** 141, 129–141.

ISHRAT, T. et al. **Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT).** *European Neuropsychopharmacology*, v. 19, n. 9, p. 636–647, 2009.

JACK, C.R., KOEPPE, R.A., JAGUST, W.J., WEINER, M.W., SAYKIN, A.J., 2014. **APOE and BCHE as modulators of cerebral amyloid deposition: a florbetapir PET genome-wide association study** 19, 351–357. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.19.APOE>

JANSEN, W.J.; et al., 2015. **Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: A meta-analysis.** JAMA - J. Am. Med. Assoc. 313, 1924–1938.
<https://doi.org/10.1001/jama.2015.4668>

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. **Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro.** International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, v. 18, n. 8, p. 781–90, 2000.

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. **Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene.** Neurochemistry International, v. 61, n. 5, p. 783–797, 2012.

KNEZOVIC, A. et al. **Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease.** Journal of Neural Transmission, v. 122, n. 4, p. 577–592, 2015.

KRASKA, A. et al. **In Vivo Cross-sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin.** PLoS ONE, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012.

LOCKRIDGE, O. **Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses.** Pharmacology and Therapeutics, v. 148, p. 34–46, 2015.

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. **A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase.** Biochemical and Biophysical Research Communications, Nova Iorque, v.189, n.3, p.1280-1286, 1992.

NASSIF, M.C., HOPPE, J., SALBEGO, C.G., 2005. **Colesterol, APOE4 e estatinas: implicações na doença de Alzheimer.** Infarma 17, 46–49. Hippocampus. Curr. Alzheimer Res. 12, 772–84.

O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. **Amyloid Precursor Protein Processing in**

Alzheimer's Disease. Annu Rev Neurosci, v. 34, n. 1, p. 185–204, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>.

PARK, S. J. et al. **Quantitative expression analysis of APP pathway and tau phosphorylation-related genes in the ICV STZ-induced non-human primate model of sporadic alzheimer's disease.** International Journal of Molecular Sciences, v. 16, n. 2, 2015.

PATTERSON, C. **World Alzheimer Report 2018. The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends.** Alzheimer's Disease International, 2018.

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. **Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase important enzymes of human body.** Acta Medica, Hradec Králové, v.47, n.4, p.215-228, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 5th edition. Ed. San Diego: Academic Press, 1997.

QUINN D. M. **Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states.** Chemical Reviews, Washington, v.87, p.955-979, 1987.

REID, G.A., DARVESH, S., 2015. **Butyrylcholinesterase-knockout reduces brain deposition of fibrillar β -amyloid in an Alzheimer mouse model.** Neuroscience 298, 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.039>

REITZ C.; BRAYNE C.; MAYEUX R.; MEDSCAPE. **Epidemiology of Alzheimer disease.** Nat. Rev. Neurol., Mar., v. 7(3), p.137-52, 2011.

REITZ, C., MAYEUX, R., 2014. **Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers.** Biochem. Pharmacol. 88, 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>

ROSTAMI, F.; JAVAN, M.; MOGHIMI, A.; HADDAD-MASHADRIZEH, A.; FEREIDONI, M. **Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin**

signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. Life Sciences. 2017 Nov; 188:172-185. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.08.025.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. **Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway.** Journal of Neurochemistry, v. 96, n. 4, p.1005–1015, 2006.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. **Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study.** Journal of Neural Transmission, v. 118, n. 5, p. 765–772, 2011.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. **What have we learned from then streptozotocininduced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research.** Journal of Neural Transmission, v. 120, n.1, p. 233–252, 2013.

Sharma, M.; Gupta, Y.; **Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment,** Life Sci. 68 (9) (2001) 1021–1029.

SIERKSMA, A. S. R. et al. **Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice.** Neurobiology of Aging, v. 34, n. 1, p. 319–337, 2013.

SMALL, D.H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. **Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease.** Neurochemistry International, Oxford, v.28, n.5-6, p.453-483, 1996

Stelzmann, R.A., Norman Schnitzlein, H., Reed Murtagh, F., 1995. **An english translation of alzheimer's 1907 paper," über eine eigenartige erkankung der hirnrinde".** Clin. Anat. 8, 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>

TAKAHASHI, R.H., NAGAO, T., GOURAS, G.K., 2017. **Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease.** *Pathol. Int.* 67, 185–193. <https://doi.org/10.1111/pin.12520>

VIJAYARAGHAVAN, S. et al. **Regulated Extracellular Choline Acetyltransferase Activity- The Plausible Missing Link of the Distant Action of Acetylcholine in the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, 2013.

VIJAYARAGHAVAN, S. et al. **Association of Butyrylcholinesterase-K allele and Apolipoprotein E ϵ 4 allele with cognitive decline in dementia with lewy bodies and Alzheimer's disease.** *J. Alzheimer's Dis.* 50, 567–576. <https://doi.org/10.3233/JAD-150750>, 2016.

WANG, J., Gu, B.J., MASTERS, C.L., WANG, Y.J., 2017. **A systemic view of Alzheimer disease - Insights from amyloid- β metabolism beyond the brain.** *Nat. Rev. Neurol.* 13, 612–623. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.111>

WEINSTOCK, M.; SHOHAM, S. **Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity.** *Journal of Neural Transmission*, v. 111, n. 3, p. 347–366, 2004.

WEISGRABER, K.H., Rall, S.C., Mahley, R.W., 1981. **Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms.** *J. Biol. Chem.* 256, 9077–9083.

WILLIAMS, J. W.; PLASSMAN, B. L.; BURKE, J.; HOLSINGER, T.; BENJAMIN, S. **Preventing Alzheimer's Disease and Cognitive Decline.** Evidence Report/Technology Assessment No. 193. (Prepared by the Duke Evidence-based Practice Center under Contract No. HHSA 290-2007-10066-I.) 86 AHRQ Publication No. 10-E005. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, 2010.

YEO, H. G. et al. **Characterization of Cerebral Damage in a Monkey Model of Alzheimer's Disease Induced by Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin.** *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 46, n. 4, p. 989–1005, 2015.