



EXENDINA-4 PROTEGE A MEMÓRIA ESPACIAL NA TAREFA DO Y-MAZE EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO-ALZHEIMER

RENAN FRANKE MONTENEGRO TORRES; FERNANDA SILVA; ADRIANA MARIA ZAGO;
JESSIE GUTIERRES; MARILDA DA CRUZ FERNANDES

RESUMO

A doença de Alzheimer é caracterizada pelo seu perfil neurodegenerativo progressivo e desenvolvimento de demência. Dentre as diversas manifestações clínicas observadas em pacientes com a doença de Alzheimer encontram-se os déficits cognitivos e confusões na memória visuo-espacial. Atualmente, a doença afeta aproximadamente 2% da população dos países industrializados e estima-se que a incidência da doença de Alzheimer irá triplicar nos próximos 50 anos, levando em conta o aumento progressivo do risco da doença após os 70 anos de idade. Nenhum dos modelos animais disponíveis é capaz de contemplar e mimetizar a ampla gama de alterações cognitivas, comportamentais, bioquímicas e histopatológicas envolvidas no desenvolvimento da doença. Entretanto, algumas dessas alterações podem ser induzidas através de manipulações farmacológicas. O modelo animal em ratos Wistar induzido pelo composto diabetogênico estreptozotocina tem mostrado ser muito eficiente ao mimetizar essa condição. Este estudo buscou avaliar as alterações comportamentais no hipocampo de ratos submetidos à injeção intracerebroventricular de estreptozotocina; bem como um possível efeito protetor do tratamento com exendina-4, um peptídeo análogo ao glucagon e agonista dos receptores de glucagon tipo peptídeo-1 (GLP-1), comumente utilizado para estimular a secreção de insulina das células β -pancreáticas dependentes de glicose e administrado para o tratamento de diabetes melitus tipo 2. Exendina-4 foi administrada intraperitonealmente uma vez ao dia após a injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (3 mg/kg, i.c.v.), e o tratamento estendeu-se até o dia 21. Os tratamentos com estreptozotocina, exendina-4, e seu agregado (estreptozotocina + exendina-4) causaram alterações significativas no peso corporal dos indivíduos quando comparados ao grupo controle. Não foram observados efeitos da exendina-4 e também nenhuma interação significativa entre os tratamentos para os níveis de glicose sanguínea. As alterações comportamentais em tarefas voltadas ao aprendizado e memória foram avaliadas, sendo possível identificar interação protetiva do exendina-4 na memória espacial contra demência esporádica do tipo Alzheimer induzida pela estreptozotocina.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Estreptozotocina, Exendina-4, Neuroinflamação, Morte celular.

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pelo seu perfil neurodegenerativo progressivo e desenvolvimento de demência. Atualmente afeta aproximadamente 2% da população dos países industrializados e após os 70 anos de idade o risco aumenta progressivamente. De todas as doenças neurodegenerativas a DA é a forma mais comum das demências, sendo um processo resultante da morte de neurônios específicos em regiões particulares com formação de agregados proteicos na sua caracterização histopatológica. Esses agregados proteicos podem ocorrer no ambiente extracelular, nas placas senis (PS); ou no interior dos neurônios, os emaranhados neurofibrilares (ENF). Essas alterações histopatológicas estão associadas com o processo neurodegenerativo e estão relacionadas com o fenômeno de perda da memória e em alguns casos mais severos até mesmo alterações da personalidade. Algumas drogas podem temporariamente melhorar a memória, porém é muito difícil conter a perda desses neurônios envolvidos com o processamento e armazenamento das informações (MATTSON, 2004 e KIMURA, 2016).

As PS são formadas por depósitos extracelulares de agregados amorfos e insolúveis do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), no entanto alguns depósitos difusos de $A\beta$ também podem estar presentes em grandes quantidades. Já os ENF são caracterizados pela proteína intracelular TAU, essa é uma proteína associada aos microtúbulos que após hiperfosforilação e/ou modificações oxidativas, formam agregados insolúveis. Tanto as PS quanto os ENF estão presentes principalmente nas regiões envolvidas com aprendizado, memória e comportamentos emocionais. Assim, essas regiões apresentam reduzidos números de sinapses e neuritos danificados pela presença dos agregados proteicos caracterizando a toxicidade (MATTSON, 2004; KIMURA, 2016).

Diversos modelos animais da DA têm sido desenvolvidos para estudar as características patológicas dessa doença, tanto modelos genéticos quanto não genéticos. Embora nenhum modelo animal disponível seja capaz de mimetizar todas as características cognitivas, comportamentais, bioquímicas e histopatológicas observadas na DA, algumas dessas alterações podem ser induzidas através de manipulações farmacológicas (YAMADA; NABESHIMA, 2000).

Um composto diabetogênico amplamente utilizado, a estreptozotocina (STZ), tem sido utilizado para induzir o modelo da DA quando administrado no ventrículo cerebral (i.c.v.) de ratos. Esse composto apresenta caráter hidrofílico devido à presença do grupamento hexose de sua estrutura que é de grande importância para ser internalizado pelas células (Chen et al, 2013). Embora o exato mecanismo de ação da STZ no sistema nervoso central (SNC) ainda não esteja completamente elucidado, já é sabido que é capaz de induzir a hiperfosforilação da TAU (LENZEN, 2007; KNEZOVIC et al., 2015). Além disso, alguns dos efeitos associados à sinalização down-stream do receptor de insulina (IR) também parecem estar envolvidos com a DA. Esses mecanismos estão diretamente relacionados com a perda da memória característica da doença (KNEZOVIC et al., 2015; KAMAT, 2015).

Mais especificamente, já foi demonstrado que o déficit de memória observado no modelo induzido por STZ está relacionado com uma redução na via de sinalização down-stream do IR na região CA3 do hipocampo de ratos (AGRAWAL et al., 2011). No entanto, estudos com pacientes portadores da DA mostraram que alteração na expressão do gene da GSK-3 β , down-stream da proteína cinase Akt, está envolvida com a presença de ENF

(SCHAFFER et al., 2008). De fato, uma sinalização aberrante da via da insulina, como ocorre no diabetes mellitus, parece estar relacionado com a formação tanto de PS quanto de ENF (KIMURA, 2016).

O período de avaliação após infusão do STZ varia de acordo com os objetivos do estudo. A literatura científica mostra dados com obtenção de déficits cognitivos já duas semanas (RODRIGUES et al., 2009), um mês (MURTISHAW et al., 2016; BIASIBETTI et al., 2017) ou ainda nove meses (KNEZOVIC et al., 2015) após a administração de STZ. Além disso, os estudos que buscam desenvolver o modelo da DA esporádica geralmente utilizam animais jovens para evitar os fatores relacionados ao envelhecimento (presente em ratos idosos), focando assim nos possíveis mecanismos envolvidos na sinalização disparada pela STZ.

Sabe-se que o hipocampo possui papel chave no processo de consolidação da memória. Os processamentos de neuroplasticidade ocorrem principalmente na região CA1, no entanto podem ser vistos na amígdala basolateral e nos córtices entorrinal, parietal e do cíngulo (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Em humanos, a lesão hipocampal produz amnésia retrógrada comprometendo ambas as memórias remotas e recentes.

Além do hipocampo, a DA também compromete outras estruturas encefálicas, com o processo degenerativo associado a disfunção insulínica e hiperfosforilação da TAU. São elas: o bulbo olfatório, o hipotálamo, diferentes regiões corticais e o cerebelo (EL KHOURY et al., 2014).

O Teste do Labirinto em Y é uma tarefa que permite avaliar a memória espacial de roedores. Resumidamente, este teste verifica se o roedor mantém na memória o espaço que acabou de explorar. Os experimentos são conduzidos em um ambiente com atenuação de sons e luz de baixa intensidade, onde o roedor é posicionado no centro de um labirinto em forma de Y. Num primeiro momento, o animal tem um intervalo de tempo para explorar dois braços (período este chamado de treino). No momento do teste (hora em que a memória é avaliada), o terceiro braço é liberado e o número de entradas e tempo gasto no braço novo é utilizado como parâmetro para avaliar a memória destes animais (GÖTZ; ITTNER, 2008).

Sabe-se que a DA não possui cura, e a busca por ferramentas que possam contribuir na prevenção ou proteção contra os efeitos deletérios nesta patologia assumem grande importância. Neste contexto, destacamos a exendina-4 (EXE-4). Esta molécula é um análogo do peptídeo-1 tipo glucagon (GLP-1) capaz de passar a barreira hemato-encefálica (CAI et al., 2014). Evidências apontam que a administração periférica deste peptídeo apresenta efeitos benéficos sobre a função cognitiva em um modelo animal de neuroinflamação associado à hiperglicemia (HUANG et al., 2012). Além disso, a ação neuroprotetora de agonistas GLP-1 já mostraram a capacidade de aumentar a neurogênese, sinaptogênese e reparação celular, bem como, suprimir a inflamação crônica reduzindo os níveis de placas amiloides (CAI et al., 2014). Mais recentemente, demonstramos que a EXE-4 foi capaz de reverter os déficits de memória na tarefa de Morris Water Maze e as alterações teciduais na barreira hemato-encefálica induzidas pela diabetes mellitus em ratos (ZANOTTO et al., 2017). Tais resultados sugerem que agonistas GLP-1, em especial EXE-4, apesar de pouco explorados, tem efeitos biológicos relevantes no SNC que vão além da homeostase da insulina e podem exercer um papel terapêutico para o tratamento de distúrbios cognitivos associados a diabetes mellitus. Com a execução deste projeto, espera-se encontrar um efeito protetor em potencial

da EXE-4 num modelo para a DA bem como descobrir possíveis mecanismos pelos quais esta molécula pode proteger as células do hipocampo contra a toxicidade induzida pelo STZ.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 (quarenta) ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos de 90 dias, mantidos sob controle de luminosidade e temperatura (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro em constantes $22 \pm 1^\circ\text{C}$) e comida e água *ad libitum* em grupos de 5 (cinco) animais em caixas limpas de polipropileno recobertas com maravalha. Os animais receberam ração padrão (50% carboidrato, 22% proteína e 4% lipídio) e para os procedimentos que demandam anestesia (cirurgia estereotáxica e punções) foi utilizado cetamina/xilazina ([60-90] e [5-10] mg/Kg respectivamente i.p.). Os animais foram aclimatizados no biotério durante 10 dias até o início do experimento. Os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei nº 11.794/2008 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica.

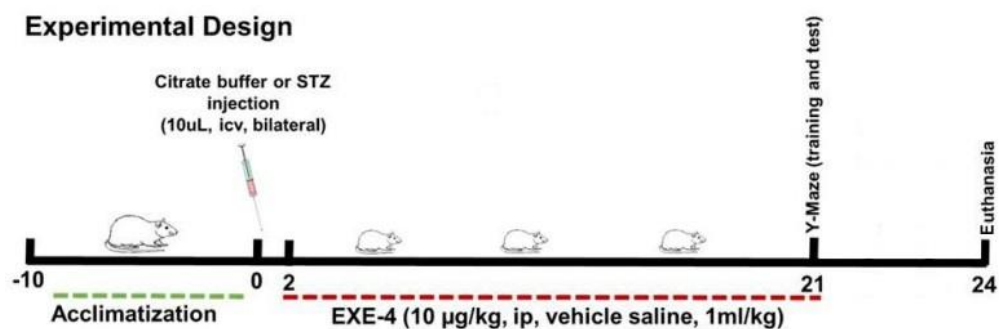


Figura 1. Desenho experimental

As administrações de estreptozotocina foram realizadas intracerebroventricular, bilateralmente num volume total de 10 uL (STZ, 3mg/kg, dissolvido em tampão citrato pH 7.4,) no dia 0.

As administrações de EXE-4 (dia 2 ao 21; dose 10 µg/kg) foram realizadas intraperitoneal (i.p). As drogas foram diluídas em solução PBS e este procedimento configura invasividade leve a moderada (ZANOTTO et al., 2017; TORTORELLI et al., 2015).

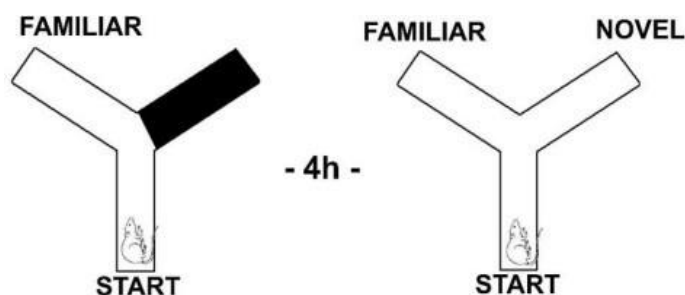


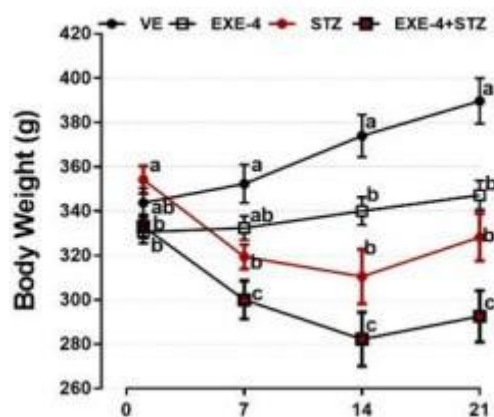
Figura 2. Desenho esquemático da execução na tarefa do Y-maze

Em ambiente de baixa luminosidade e silencioso, o roedor foi posicionado no fim do braço em Y (posição central do aparato) com acesso a apenas um dos braços. Durante os 5

primeiros minutos os animais puderam explorar dois braços. Ao término da habituação, o animal teve acesso ao braço novo. O teste foi realizado 4 horas após o treino para verificar a memória de curta duração. O número de entradas e o tempo gasto no braço novo foram utilizados como parâmetro para avaliação cognitiva (GÖTZ; ITTNER, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gráfico 1 mostra que não houve diferença significativa entre os tratamentos quando comparados ao grupo veículo ($F(3,33)=3.484$; $P=0,0266$) no dia 1. No sétimo dia, ocorreu uma redução significativa do peso corporal ($F(3,33)=9.224$; $P=0,0001$) induzida por STZ em relação ao grupo veículo (vehicle vs STZ, $P=0,0024$; vehicle vs EXE-4+STZ, $P<0,0001$; EXE-4 vs STZ, $P=0,0034$). Os grupos EXE-4, STZ e EXE-4+STZ apresentaram uma redução significativa do peso corporal no décimo quarto dia comparado ao grupo veículo ($F(3,33)=13,73$; $P<0,0001$) (vehicle vs EXE-4, $P=0,0309$; vehicle vs STZ, $P=0,0001$; EXE-4 vs STZ, $P=0,0005$). O mesmo efeito também foi observado no 21 dia, onde todos os tratamentos reduziram o peso corporal ($F(3,33)=15,85$; $P<0,0001$) (vehicle vs EXE-4 $P=0,0058$; vehicle vs STZ, $P<0,0001$; vehicle vs EXE-4+STZ, $P<0,0001$; EXE-4 vs EXE-4+STZ, $P=0,0006$; STZ vs EXE-4+STZ, $P=0,0159$). Ao longo dos 21 dias, tanto a indução de demência esporádica tipo Alzheimer quanto o tratamento com EXE-4 reduziram o peso corporal. Além disso, STZ mostrou um efeito mais robusto na redução do peso corporal quando comparado com a EXE-4. A interação dos tratamentos EXE-4 + STZ mostrou um efeito somatório reduzindo ainda mais o peso corporal. $P<0.05$ foi considerado significativo. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média para $n=9-10$.

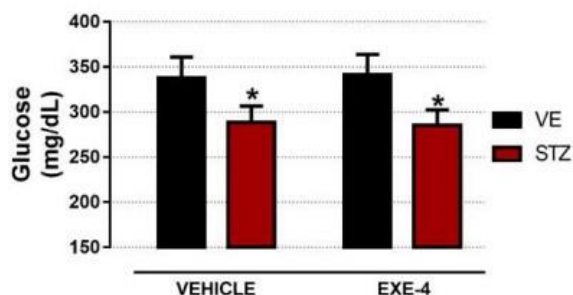


* $P<0.05$ foi considerado significativo.

**Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média para $n=9-10$.

Gráfico 1. Efeito do tratamento com exendina-4 em ratos submetidos a um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer sobre o peso corporal

O gráfico 2 mostra que STZ reduziu os níveis de glicose no sangue dos grupos STZ e EXE-4+STZ ($F(1,32)=6.668$; $P=0,0148$), descartando um quadro hiperglicêmico de diabetes. Não foram observados efeitos da EXE-4 ($F(1,32)=0,005$; $P=0,9812$) e também nenhuma interação significativa entre os tratamentos ($F(1,32)=0,024$, $P=0,877$) para os níveis de glicose sanguínea. $P<0.05$ foi considerado significativo. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média para $n=9-10$.



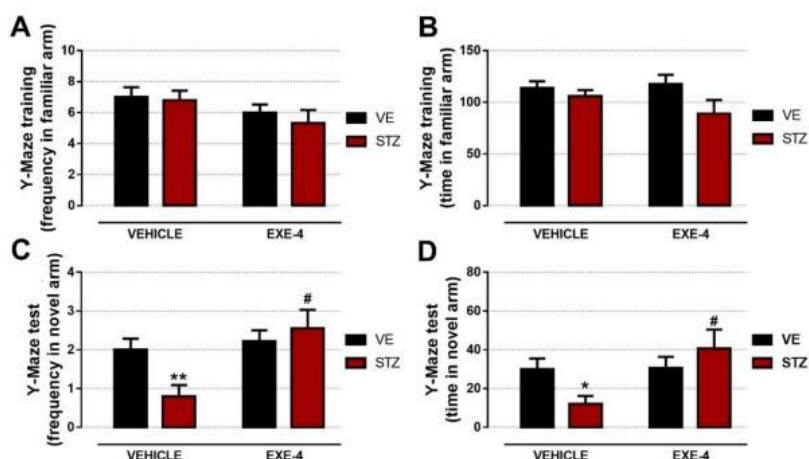
* $P < 0.05$ foi considerado significativo.

**Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média para $n=9-10$.

Gráfico 2. Níveis de glicose plasmática após a eutanásia.

O gráfico 3A e 3B mostram que EXE-4 e STZ não alteram a frequência dos animais no braço familiar ($F(1,33)=1.255$; $P=0,2707$, graph 3A) nem o tempo gasto no braço familiar ($F(1,33)=0.123$; $P=0,7288$, graph 3B).

O gráfico 3C mostra que houve uma interação significativa entre os tratamentos onde EXE-4 protege contra a redução na frequência dos animais no braço novo induzida pelo STZ ($F(1,33)=5,061$; $P=0,0313$, graph 3C). Além disso, o mesmo efeito protetor foi visto quando avaliado o tempo gasto no braço novo ($F(1,31)=4,909$; $P=0,0342$, graph 3D).



* $P < 0.05$ foi considerado significativo.

**Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média para $n=9-10$.

Gráfico 3. Efeito do tratamento com exendina-4 (EXE-4, 10 μ g/kg, ip) em ratos submetidos a um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer (STZ, 3mg/kg, icv) sobre a performance na tarefa do Y-Maze.

CONCLUSÃO

O projeto obteve resultados interessantes e impactantes para a área e demonstraram um efeito protetivo do tratamento com exendina-4 em ratos submetidos a um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer (DETA) sobre a memória espacial, na tarefa do Y-Maze, que está prejudicada em ratos submetidos a um modelo de DETA e foram revertidos pelo tratamento com EXE-4.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, R. et al. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: A study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *European Neuropsychopharmacology*, v. 21, n. 3, p. 261–273, mar. 2011.

BIASIBETTI, R. et al. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behavioural Brain Research*, v. 316, p. 205–214, 1 jan. 2017.

CHEN, Y. et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Molecular neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 711–25, 2013.

GÖTZ, J.; ITTNER, L. M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, n. 7, p. 532–544, jul. 2008.

CAI, H.-Y. . et al. Lixisenatide rescues spatial memory and synaptic plasticity from amyloid β protein-induced impairments in rats. *Neuroscience*, v. 277, p. 6–13, set. 2014.

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.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 68, n. 3, p. 285–316, nov. 1997.

EL KHOURY, N. B. et al. Insulin dysfunction and Tau pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, 2014.

KIMURA, N. Diabetes Mellitus Induces Alzheimer's Disease Pathology: Histopathological Evidence from Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 4, p. 503, 5 abr. 2016.

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, 26 mar. 2015.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216–226, 18 dez. 2007.

KAMAT, P. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural Regeneration Research*, v. 10, n. 7, p. 1050, 2015.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, v. 430, n. 7000, p. 631–639, ago. 2004.

MURTISHAW, A. S. et al. Effect of acute lipopolysaccharide-induced inflammation in intracerebroventricular-streptozotocin injected rats. *Neuropharmacology*, v. 101, p. 110–122, fev. 2016.

PIAZZA, F. V. et al. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behavioural Brain Research*, v. 217, n. 1, p. 16–20, fev. 2011. RAHMEIER, F. L. et al. The effect of taurine and enriched environment on behaviour, memory and hippocampus of diabetic rats. *Neuroscience Letters*, v. 630, p. 84–92, set. 2016.

RODRIGUES, L. et al. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 17, n. 1, p. 193–202, 2009.

SCHAFFER, B. A. J. et al. Association of GSK3B With Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia. *Archives of Neurology*, v. 65, n. 10, p. 1368–1374, 13 out. 2008.

TORTORELLI, L. S. et al. Cocaine counteracts LPS-induced hypolocomotion and triggers locomotor sensitization expression. *Behavioural Brain Research*, v. 287, p. 226–229, 2015.

VERRET, L. et al. Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging*, v. 34, n. 1, p. 211–225, jan. 2013.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 88, n. 2, p. 93–113, nov. 2000.

ZANOTTO, C. et al. Exendin-4 Reverses Biochemical and Functional Alterations in the Blood-Brain and Blood-CSF Barriers in Diabetic Rats. *Molecular Neurobiology*, v. 54, n. 3, p. 2154–2166, 1 abr. 2017.