

**DÉFICIT DE MEMÓRIA EM RATOS SUBMETIDOS À INDUÇÃO A DOENÇA DE ALZHEIMER POR INFUSÃO INTRACEREBRAL DE B-AMILOIDE<sub>1-42</sub>**  
(MEMORY DEFICIT IN RATS SUBMITTED TO INDUCTION ALZHEIMER'S DISEASE IN INFUSION OF INTRACEREBRAL B-AMILOIDE<sub>1-42</sub>)

Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho<sup>1\*</sup>; Roberta Cristina da Rocha-e-Silva<sup>2</sup>; Daiana Suely Peixoto<sup>1</sup>; Vitor Viana da Costa<sup>1</sup>; Paula Matias Soares<sup>1</sup>; Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Ceará

<sup>2</sup> Universidade Federal do Ceará

**ABSTRACT**

Alzheimer's disease (AD) was established as the neurodegenerative dementia, which leads to progressive and irreversible cognitive decline, memory loss, attention and judgment. It is characterized by molecular injuries resulting from the accumulation of charged neuritic plaques of  $\beta$ -amyloid and neurofibrillary tangles causing oxidative damage and inflammatory. Thus, the aim of this study was to evaluate the learning and memory of rats seven days after infusion of  $\beta$ -amiloide<sub>1-42</sub>. The  $\beta$ -amiloide<sub>1-42</sub> was prepared in saline protein (1 $\mu$ g /  $\mu$ L) and incubated at 37 ° C for three days to form the aggregate. The animals were anesthetized with the combination of ketamine (100 mg / kg) and xylazine (10 mg / kg) intraperitoneally, and fixed in a stereotaxic route. The aggregate was infused directly in the hippocampus (5 $\mu$ L bilaterally) in the coordinates, AP: -3.5 mm; LL:  $\pm$  2.0 mm; DV: -3.5. The learning and memory was assessed using the Morris water maze. The apparatus consists of a circular water tank (120 cm diameter and 60 cm high) with an escape platform (12.5 cm in diameter and 38 cm high) positioned invisible to the mice 2 cm below the water level. The tank was divided by imaginary lines (N, S, L, and O) in four quadrants (1, 2, 3 and 4) and identified by the same geometrical symbols, which remained the same throughout the study. The animals were placed facing the geometric shapes and the exhaust time measured during four consecutive days (training). In the fifth and final day it was taken to the escape platform and computed the total residence time in the target quadrant (test). The maximum time for each step was 60s. This study was approved by Ethics Committee for Animal Use (CEUA) of the State University of Ceará (UECE) by the number 2542310/2015. To analyze the learning we used the ANOVA two way with Bonferroni post-test. To verify differences in memory between the groups we used the Student t test. P <0.05 significance level was adopted. The results show no difference in learning the animals infused with  $\beta$ -amiloide<sub>1-42</sub> compared with Sham group (Sham day 1=11,2 $\pm$ 4,9, 2=7,5 $\pm$ 5,1 3=6,67 $\pm$ 4,8 4=7,8 $\pm$ 4,1; Alzheimer day 1=12,9 $\pm$ 4,0; 2=8,1 $\pm$ 3,4; 3=5,7 $\pm$ 2,1; 4=8,9 $\pm$ 4,5), possibly caused by compensatory mechanisms, as DA begins with mild cognitive impairment (MCI) did not present symptoms such as aphasia, apraxia and agnosia. However, the memory test showed marked decline in latency time (memory) in the animals (Escape latency Sham=25,2 $\pm$ 3,8; Alzheimer= 15,8 $\pm$ 3,7 p<0,0001), suggesting that the aggregate is able to quickly lock the new memories formation mechanism, altering synaptic plasticity, in addition to discontinue synaptic function already after seven day infusion. Notwithstanding the A $\beta$  accumulation interrupts the correct release of neurotransmitter due to stimulation of presynaptic receptor. Therefore, it is concluded that the infusion of A $\beta$ <sub>1-42</sub> was able to decrease the memory seven days after infusion without significant changes in learning.

**KEYWORDS:** Neuritic plaques; Cognitive impairment; Stereotactic surgery

**INTRODUÇÃO**

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência neurodegenerativa, onde os danos causados ao encéfalo são progressivos e irreversíveis (De Sá Cavalcanti e Engelhardt, 2012). Caracteriza-se por lesões moleculares decorrentes do acúmulo de placas neuríticas carregadas de  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) e emaranhados neurofibrilares causando danos oxidativos e inflamatórios, levando a falhas no metabolismo

\*Autor correspondência: [janainaserrazul@gmail.com](mailto:janainaserrazul@gmail.com)  
Resumo em Português disponível no Suplemento

energético e disfunção sináptica, gerando déficits em diversos neurotransmissores, como acetilcolina, noradrenalina e serotonina e morte celular neuronal (Querfurth & LaFerla, 2010).

Evidências indicam que a elevação e o acúmulo da proteína A $\beta$  no cérebro seja o principal mediador para a patogênese da DA. Esses peptídeos são originados da proteólise da Proteína Precursora de Amiloide (APP) pelas ações de secretases. A clivagem da APP pode acontecer por dois caminhos, um neuroprotetor e outro neurotóxico. Quando APP é clivada por ação da  $\alpha$ -secretase, uma proteína não amiloidogênica é formada, tendo ações neuroprotetoras (Querfurth & LaFerla., 2010). A formação da via amiloidogênica se inicia com a clivagem de APP por  $\beta$ -secretases permitindo que seu ectodomínio seja perdido no fluido luminal e extracelular, deixando a membrana em direção à ponta C-terminal, que é clivado por  $\gamma$ -secretase acarretando na liberação de A $\beta$  (Walsh & Selkoe, 2007). Não obstante, sua atividade neurotóxica ocorre mediante reorganização estrutural, que constitui na união de formas derivadas de A $\beta$ , como monômeros, dímeros e trímeros, que se agregam, formando oligômeros de dimensões diversas (De Sá Cavalcanti & Engelhardt, 2012).

Com isso, o presente estudo teve como objetivo verificar déficits na memória e aprendizado de ratos submetidos à cirurgia esterotáxica e infundidos com oligômeros de A $\beta$ <sub>1-42</sub> intracerebral.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 16 ratos machos albinos da linhagem Wistar com 3- 4 meses de vida e peso médio de 250 - 300g, obtidos no Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram divididos em dois grupos (Sham e Alzheimer) homogêneos em peso e perfil cognitivo (memória espacial), medido através do protocolo do labirinto aquático de Morris. Foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), em ambiente com temperatura controlada entre 22 a 25°C, e com ração e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará registrado sob número 2542310/2015.

### Indução à Doença de Alzheimer experimental

O agregado A $\beta$  foi preparado a partir de uma solução de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Sigma-Aldrich, Inc.) em solução salina (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) com pH 7,4 e incubada a 37°C durante três dias para formar o agregado A $\beta$ . Os animais foram anestesiados com a associação de Ketamina (100 mg / kg) e Xilazina

(10 mg/kg) por via intraperitoneal e fixados em estereotáxico (Insight Ltda). O agregado foi infundido diretamente no hipocampo com o auxílio de uma microseringa Hamilton nas coordenadas, AP: -3,5 mm a partir do bregma; LL:  $\pm$ 2,0 mm da linha média; DV: -3,5 mm a partir da superfície do cérebro (Paxinos & Watson, 2009). O volume total de inoculado foi de 10 $\mu$ L de agregado de A $\beta$  bilateralmente (5 $\mu$ L) (Prakash, Medhi & Chopra, 2013).

### Labirinto aquático de Morris

A memória espacial foi verificada pelo labirinto aquático de Morris após sete dias do procedimento cirúrgico. O aparelho consiste em um tanque de água circular (120 cm de diâmetro e 60 cm de altura) com uma plataforma (12.5 cm de diâmetro e 38 cm de altura) invisíveis para os ratos posicionada 2 cm abaixo do nível da água dentro do tanque com água mantida a 25,5  $\pm$  2 ° C, a uma altura de 40 cm.

O tanque foi dividido em quatro quadrantes de tamanhos iguais, através de linhas imaginárias (Norte, Sul, Leste, Oeste) interligadas por símbolos geométricos na parede do tanque. A posição dos símbolos permaneceu inalterada durante todo o estudo. Os ratos foram posicionados no tanque de frente a forma geométrica de cada quadrante durante quatro dias (treino). No quinto dia os ratos foram colocados no labirinto aquático como no treinamento, no entanto a plataforma oculta foi retirada do quadrante alvo e o tempo total gasto no quadrante alvo foi gravado durante 60 s.

### Análise estatística

Os dados foram tratados em média e desvio padrão. Para análise e comparação da aprendizagem durante o treinamento do labirinto aquático foi utilizado o teste ANOVA Two Way com post test de Bonferroni. Para verificar diferenças na memória entre os grupos foi utilizado o Teste T de Student. Foi adotado nível de significância  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

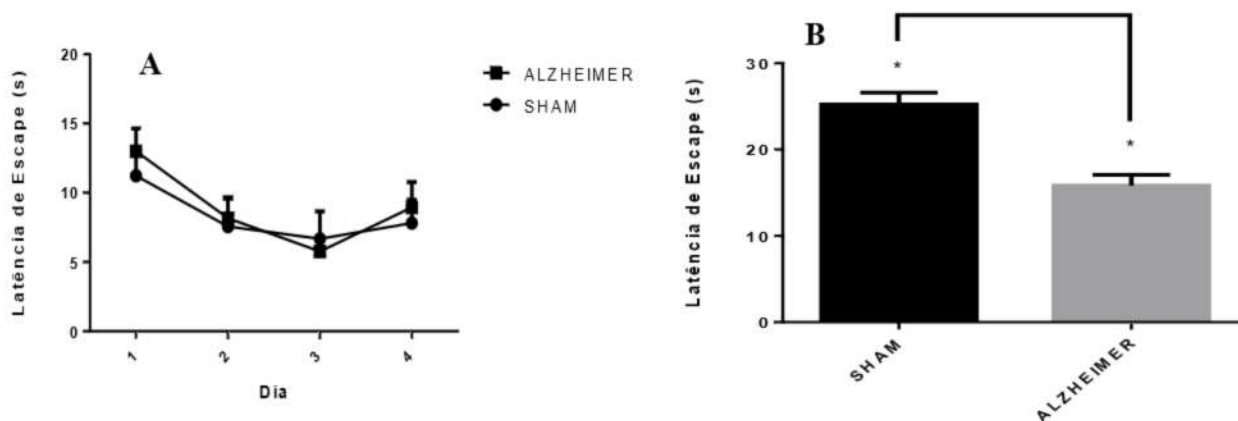
A partir do teste ANOVA two way verificou-se que a inoculação do agregado de A $\beta$  não foi capaz de interferir no aprendizado visto que o tempo de latência de escape nos treinos foram os mesmos nos dois grupos (Sham dia 1=11,2 $\pm$ 4,9, 2=7,5 $\pm$ 5,1 3=6,67 $\pm$ 4,8 4=7,8 $\pm$ 4,1; Alzheimer dia 1=12,9 $\pm$ 4,0; 2=8,1 $\pm$ 3,4; 3=5,7 $\pm$ 2,1; 4=8,9 $\pm$ 4,5) (figura 1A). Possivelmente por mecanismos compensatórios, visto que a DA inicia-se com o declínio cognitivo leve (DCL) não apresentando sintomas como de afasia, agnosia e apraxia (Stahl, 2010). No teste de memória observou-se

acentuado declínio no grupo inoculado com o agregado de A $\beta$  (Latência de escape Sham=25,2 $\pm$ 3,8; Alzheimer= 15,8 $\pm$ 3,7 p<0,0001) (figura 1B), assim como verificado por outros autores (Dodart et al., 2002; Sheng, Sabatini e Sudhof, 2012). Esses déficits são decorrentes da capacidade dos oligômeros de bloquear rapidamente o mecanismo de formação de novas memórias, alterando a plasticidade sináptica, além de interromperem a função sináptica (Lacor et al., 2004), afetando assim, a transmissão por causa do comprometimento pós-sináptico (Sheng, Sabatini & Sudhof, 2012) e pré-sináptico por meio da estimulação da A $\beta$  nos receptores nAChRs (pré-sinápticos) dificultando a liberação de neurotransmissores (Dougherty et al., 2003). Além disso, o acúmulo de A $\beta$  desencadeia uma série de alterações bioquímicas, incluindo respostas inflamatórias, ativação da micróglia e de astrócitos, além da liberação de citocinas e radicais livres, acarretando prejuízos à memória (STAHL, 2010). Todavia, a associação desses

fatores estimula ainda mais a produção de A $\beta$  e toda a via amiloidogênica consequentemente agravando ainda mais a DA e consequentemente seus danos cognitivos, principalmente a memória (Querfurth e LaFerla., 2010).

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que a infusão de A $\beta$ 1-42 não foi capaz de interferir na capacidade de aprendizado dos animais sete dias após infusão do agregado, possivelmente pela ação de mecanismos compensatórios. No entanto, foi observada diminuição significativa na memória desses animais indicando que a infusão A $\beta$ 1-42 atinge primeiro os mecanismos de formação de memória recente. Não obstante, são necessários estudos avaliando os mesmos parâmetros com maiores intervalos após o procedimento cirúrgico.



**FIGURA 1** – Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. O teste ANOVA Two way com pós teste de Bonferroni mostrou que não houve diferenças estatísticas entre o grupo Sham e o grupo Alzheimer no aprendizado (A). O Teste T de Student mostrou diminuição significativa da memória entre os grupos Sham e Alzheimer com p<0,0001.

## REFERÊNCIAS

- DE SÁ CAVALCANTI, J. L.; ENGELHARDT, E. Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica. *Rev Bras Neurol*, v. 48, n. 4, p. 21-29, 2012.
- DODART, J. C.; BALES, K. R.; GANNON, K. S.; GREENE, S. J.; DEMATTOS, R. B.; MATHIS, C.; PAUL, S. M. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A $\beta$  burden in Alzheimer's disease model. *Nature neuroscience*, v. 5, n. 5, p. 452-457, 2002.
- DOUGHERTY, JOHN J.; WU, JIANLIN; NICHOLS, ROBERT A.  $\beta$ -Amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex. *The Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 17, p. 6740-6747, 2003.
- LACOR, P. N.; BUNIEL, M. C.; CHANG, L.; FERNANDEZ, S. J.; GONG, Y.; VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid  $\beta$  oligomers. *The Journal of neuroscience*, v. 24, n. 45, p. 10191-10200, 2004.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat brain: in stereotaxic coordinates. 6. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2009. 329 p.
- PRAKASH, A.; MEDHI, B.; CHOPRA, K. Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid- $\beta$  induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 110, p. 46-57, 2013.
- QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease REPLY. *New England Journal of Medicine*, v. 362, n. 19, p. 1844-1845, 2010.
- SHENG, M.; SABATINI, B. L.; SÜDHOF, T. C. Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 4, n. 5, p. a005777, 2012.
- STAHL, S. M. Guanabara Koogan. Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas. Rio de Janeiro, 2010.
- WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. A $\beta$  oligomers—a decade of discovery. *Journal of neurochemistry*, v. 101, n. 5, p. 1172-1184, 2007.