

Fábio Antônio Borges Vigil

**Efeitos da aprendizagem espacial associada a uma alta concentração
de β -amilóide hipocampal sobre parâmetros inflamatórios,
morfológicos e neuroquímicos centrais**

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2012

Efeitos da aprendizagem espacial associada a uma alta concentração de β -amilóide hipocampal sobre parâmetros inflamatórios, morfológicos e neuroquímicos centrais

Fábio A. B .Vigil ^a, Luíza da Silva Miranda ^c, Ana Raquel Pereira Caixeta ^a, Aline Silva de Miranda ^b, Rosa M. E. Arantes ^c, Antônio Lúcio T. Junior ^b, Ângela M. Ribeiro ^a

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia

^b Departamento de Clínica Médica

^c Departamento de Patologia

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

2012

Agradecimentos

Gostaria de agradecer as três famílias que a vida me presenteou:

- A minha família biológica pelo apoio e amor incondicional. Em especial aos meus pais por terem despertado em mim a paixão pelos estudos e as minhas irmãs por terem despertado em mim a paixão pela vida.
- Aos companheiros de trabalho do LaNeC sem os quais nada disso teria sido possível. Em especial a professora Ângela, por transformar uma criança em um pesquisador.
- Aos amigos do colégio, da Pampulha e do ICB. Por terem compartilhado esses anos de mestrado comigo. Fico feliz em dizer que um pedaço das crenças de cada um de vocês agora faz parte de mim e também dessa dissertação.

Gostaria também de agradecer a Livinha, minha cara metade, pedaço essencial do meu ser.

"O pensamento parece uma coisa à toa, mas como é que a gente voa, quando começa a pensar!"

Lupicínio Rodrigues

“A origem da nossa noção do conhecimento – Deparei-me com essa explicação na rua quando ouvi um homem do povo dizer: “Ele reconheceu-me”; diante disso perguntei-me: o que o povo entende, realmente, por conhecimento?... Simplesmente isto: reduzir algo de estranho para algo conhecido...

O conhecido, ou seja, as coisas a que nos habituamos, de tal modo que já deixamos de nos espantar... Não será o instinto do medo que nos força a conhecer? O encanto que acompanha a aquisição do conhecimento não será a volúpia da segurança reconquistada?... Aquilo que chamam conhecido é o habitual, e o habitual é precisamente o que há de mais difícil de conhecer, ou seja, de considerar como um problema, como uma coisa desconhecida, distante, exterior a nós próprios...”

Friedrich Nietzsche – A Gaia Ciência

Índice

Lista de abreviações	7
<i>Abstract</i>	8
Resumo	10
Introdução	12
Objetivos	27
Matérias e métodos	28
Delineamento Experimental	28
Tarefa no Labirinto Aquático de Morris	33
Cirurgia de Estereotaxia	35
Preparo e injeção da solução de oligômeros de beta-amiloide	36
Análise da solução de oligômeros de beta-amilóide	37
Sacrifício dos animais e Dissecção	38
Determinações de Parâmetros Glutamatérgicos e GABAérgicos	40
Parâmetros imunológicos: Dosagem das Citocinas	41
Estudos Morfológicos: Preparo das Lâminas	43
Análise da mielina do Giro Dentado do hipocampal	43
Análise da área de núcleo de células do Giro Dentado do hipocampo	44
Análise estatística	45
Resultados	48
Experimentos Controles Laterais	48
Efeito da cirurgia de estereotaxia	48
Efeito da tarefa no LAM com e sem o componente cognitivo	51
Análise da solução de oligômeros de BA	57
Efeitos do treinamento cognitivo espacial no LAM, Injeção de oligômeros de BA e Relação entre os dois fatores	59
Parâmetros Comportamentais.....	59
Parâmetros Neuroquímicos	65
Determinações dos níveis de Citocinas no hipocampo	69
Parâmetros Morfológicos	74
Regressão Linear Múltipla	77
Discussão e Conclusão	81
Efeitos da cirurgia de estereotaxia.....	81
Efeito do treinamento com ou sem esforço cognitivo	82
Efeitos do treinamento cognitivo espacial no LAM, Injeção de oligômeros de BA e Relação entre os dois fatores	83
Bibliografia	91

Lista de abreviações:

ANOVA: Análise de Variância
AMPA: Acido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
BA: Beta Amilóide
Cdk5: Cinase dependente de ciclina 5
DA: Doença de Alzheimer
DMSO: Dimetilsulfóxido
EA: Enriquecimento Ambiental
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
GABA: Ácido Gama-amino-butírico
GD: Giro Denteado
GLT-1/EAAT2: Transportador de Glutamato do tipo 1 em associação com o Transportador de Aminoácidos Excitatórios do tipo 2
GSK-3 β : Glicogênio Sintase Cinase 3 Beta
HE: Hematoxilina e Eosina
HFIP: 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
IL-1 β : Interleucina 1 Beta
IL-6: Interleucina 6
LAM: Labirinto Aquático de Morris
LPS: Lipossacarídeos
LTD: *Long term depression*
LTP: *Long term potentiation*
MBP: Proteína Básica da Mielina
MFA: Microscopia de Força Atômica
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
MPA: 3-mercaptopropiônico
MWM: *Morris Water Maze*
NMDA: N-metil-D-Aspartado
NR2B: N-metil D-aspartato 2B
OMS: Organização Mundial de Saúde
OPA: Orto-oftaldeído
PP2B: Proteína Fosfatase do tipo 2 B
PPA: Proteína Precursora Amilóide
SEM: Erro Padrão
SNC: Sistema Nervoso Central
TGF- β : Fator de transformação do crescimento Beta
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular
VIF: Fator de Inflação da Variância

Abstract

The injection of Beta Amyloid peptide has long been study to assess some aspects of the Alzheimer's Disease molecular mechanisms. Many authors have observed changes in the neurochemistry, cytokines and morphological parameters, but the literature still has little information about the correlations among these parameters. Furthermore, many questions remain to be answered concerning the effects of Beta Amyloid peptide in the oligomer state of agglomeration. There is also very few studies on how cognitive training can affect the Beta Amyloid effects on the brain. Considering these scientific backgrounds the aims of the present study were to verify the effects of intra-hippocampal Beta Amyloid oligomers injection on animals with or without training by the Morris Water Maze (MWM: a spatial cognitive task) on neurochemistry, cytokines and morphological parameters of the hippocampus. In order to differentiate the effects of the cognitive effort demanded on the Morris task from those induced by the exercise/stress also present in this task, a lateral control experiment was performed comparing animals trained on the classic design of the task with animals only submitted to swimming in the apparatus. We observed that the cognitive effort demanded by the task increased the myelin on the hippocampus at levels significantly higher compared to the effect caused by the swimming task without cognitive training. . We also observed that animals submitted to the cognitive training showed different behaviors during the task performance when compared with animals that only swam in the pool. We proposed that this behavioral difference could be due to the differences between the animals of the two groups regarding the state of motivation. The results of the present study show that Beta Amyloid injection decreases the difference between the amounts of glutamate released from the hippocampal in normal and stimulated (higher KCl concentration) conditions. This effect of Beta Amyloid treatment was prevented by training in the MWM task before the BA injection. Spatial training also changes the effects of Beta Amyloid injection on TNF- α concentration in the hippocampus. On the other hand, Beta Amyloid injection decreased the levels of IL-10 on the hippocampus in a

matter that could not be prevented by the training. Furthermore, we verified an increase in the IL-1 β levels due to the MWM training, independent of the Beta Amyloid treatment. Finally, the results show that an increase in the hippocampal Beta Amyloid concentration can interfere with the increase of myelin on the hippocampus induced by the spatial cognitive training. From the data obtained in the multiple linear regression analyses we raised the hypothesis that the central nervous system work together with the immune system to compensate the effects of Beta Amyloid injection. Likely, the cooperation between these two systems is also required by learning and memory processes.

Resumo

A injeção de peptídeo Beta Amiloide tem sido usada como modelo para estudar alguns aspectos das bases moleculares da doença de Alzheimer. Muitos autores observaram alterações em parâmetros neuroquímicos, inflamatórios e morfológicos devido a injeção de Beta Amiloide. Contudo pouco se sabe a respeito da interação entre esses parâmetros. É sabido que a forma oligomérica desse peptídeo possui maior efeito citotóxico, porém pouco se sabe a respeito de como o sistema nervoso central reponde á presença desses oligômeros. Também existem relativamente poucos dados a respeito dos efeitos do treinamento cognitivo na progressão da doença de Alzheimer. Considerando essas informações objetivamos nesse estudo avaliar os efeitos da injeção de oligômeros de Beta Amiloide, com ou sem treinamento no Labirinto Aquático de Morris, em parâmetros neuroquímicos inflamatórios e morfológicos hipocampais. A fim de diferenciar os efeitos do esforço cognitivo no labirinto de Morris dos fatores estresse e exercício físico, também presentes nessa tarefa, um experimento controle lateral foi realizado comparando animais treinados no labirinto aquático com ou sem tarefa espacial. Observamos que o esforço cognitivo demandado pela tarefa especial aumentou a mielinização no hipocampo de maneira significativa quando comparado com os animais que somente foram submetidos à natação no aparato. Também foi observado que os animais submetidos ao treinamento cognitivo apresentaram comportamentos distintos dos animais submetidos simplesmente à natação no labirinto. Levantamos a hipótese que tal diferença comportamental se deve a diferença motivacional apresentada pelos ratos nos diferentes modelos da tarefa. Os resultados do presente estudo mostram que a injeção de Beta Amiloide diminuiu a diferença entre a liberação de glutamato em meio normal e estimulado (alta concentração de KCl). Esse efeito foi evitado com o treinamento prévio na tarefa espacial de Morris. O treinamento espacial também alterou o efeito dos oligômeros de Beta Amiloide na concentração da citocina TNF- α no hipocampo. Contudo o treinamento cognitivo não foi capaz de impedir o decréscimo na concentração de IL-10 ocasionado pela presença do peptídeo Beta Amiloide. Foi observado ainda, um aumento na concentração de IL-1 β devido ao treinamento no labirinto aquático, independente

da injeção de Beta Amiloide. Por fim os resultados mostram que o aumento na concentração de Beta Amiloide interfere no aumento de mielinização ocasionado pelo esforço cognitivo. Dados obtidos em análise de regressão linear múltipla mostram uma relação entre os níveis de TNF- α e a diferença de liberação em meio normal e estimulado de GABA e glutamato pelas células hipocâmpais. Foi observada também uma relação entre a liberação desses neurotransmissores e os níveis de mielinização do hipocampo. Esses dados sugerem que o sistema nervoso e o sistema imune trabalham conjuntamente para compensar os efeitos da injeção de Beta Amiloide. Da mesma maneira a cooperação entre ambos os sistemas parece ser necessária para os processos de aprendizado e memória.

Introdução

Os fenômenos abordados no presente estudo são a aprendizagem de uma tarefa espacial e a injeção de oligômeros de peptídeo Beta Amilóide (BA), sendo esse último modelo utilizado para estudar aspectos do mecanismo molecular envolvido com disfunções em processos neurobiológicos na Doença de Alzheimer (DA). Uma das questões centrais levantadas é se os efeitos da injeção de BA são diferentes em animais que passaram pelo treinamento cognitivo em tarefa espacial, quando comparado à animais não treinados.

A DA foi descrita pelo Dr. Alois Alzheimer em 1906. De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2001 existiam cerca de 18 milhões de pessoas que sofriam de DA. A previsão é que esse número será de 34 milhões de pessoas em 2025. Estima-se que no ano de 2001, 50% desses pacientes viviam em países de baixo e médio rendimento e que em 2025 serão mais de 70%. Esse aumento se deve ao aumento do número de pessoas idosas nesses países (VAS, RAJKUMAR, *et al.*, 2001). Em 2010, existiam cerca de 8,7 milhões de pessoas acima de 60 anos na América do Sul. Essa população possuía uma estimativa bruta de prevalência de DA e outras demências de 7%, totalizando 0,61 milhões de pacientes. Esse número pode vir a ser de 1,83 milhões de dementes na América do Sul no ano de 2050 (FERRI, SOUSA, *et al.*, 2009). A probabilidade de diagnóstico de DA em pessoas de 65 a 85 anos dobra a cada 5 anos (VAS, RAJKUMAR, *et al.*, 2001). A DA não possui maior prevalência em ambientes rurais ou urbanos. Existem certas contradições quanto a sua prevalência maior em indivíduos do sexo feminino, devido à maior longevidade dos indivíduos desse gênero, que poderiam influir na análise (VAS, RAJKUMAR, *et al.*, 2001; FERRI, SOUSA, *et al.*, 2009). O sintoma clínico mais característico da DA é o declínio cognitivo. O doente geralmente apresenta, inicialmente, déficits de aprendizado e memória com posterior aparecimento de mioclono e perturbação da marcha. Em aproximadamente 10% dos indivíduos com esse transtorno ocorrem convulsões (SUL, 1994). O diagnóstico clínico é feito com base no aparecimento desses sintomas e a partir da exclusão das outras demências.

Contudo o diagnóstico definitivo da DA é possível somente a partir do exame anatomopatológico *post mortem* do cérebro do doente. O paciente deve apresentar os seguintes marcadores anatomopatológicos, já descritos pelo Dr. Alzheimer em 1906:

-Acúmulo de placas senis

-Emaranhados neurofibrilares

-Diminuição do volume encefálico com alargamento dos sulcos e ventrículos (SUL, 1994).

As placas senis são constituídas de peptídeo BA gerado a partir da degradação da Proteína Precursora beta-Amiloide (PPA). A PPA pode ser degradada via ação da enzima α e γ secretases ou via β e γ secretases, ocorrendo somente por meio dessa segunda via a formação de peptídeos BA contendo 40 ou 42 aminoácidos, peptídeos esses que apresentam maior probabilidade de formar agregados insolúveis. Produzido em sua forma solúvel o peptídeo BA tende a se aglomerar. Inicialmente são formados pequenos dímeros, trímeros e, posteriormente, oligômeros (KLEIN, 2002). Esses oligômeros se agregam dando origem as fibrilas que por sua vez darão origem as placas senis. A **figura 1** adaptada do artigo de STINE, DAHLGREN, *et al.* (2003) exemplifica através de imagens em Microscopia de Força Atômica (MFA) a formação das placas senis. Contudo essa parece não ser a única dinâmica de formação das placas senis, uma vez que existem indícios de sua formação sem o aparecimento da etapa oligomérica (CREWS e MASLIAH, 2010).

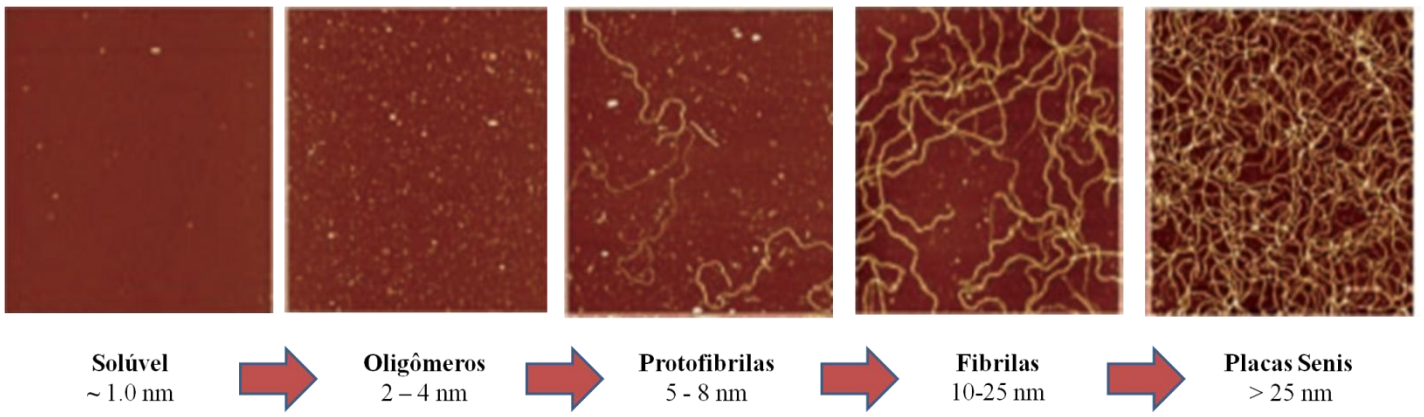


Figura 1 – Figura adaptada do artigo de STINE (2003). A sequência de imagens de MFA exemplifica a formação de placas senis de peptídeo BA. O valor Z observado na MFA em cada fase de aglomeração do peptídeo está representado em nm. O BA, produzido em forma solúvel, se aglomera formando oligômeros que por sua vez se juntam formando protofibrilas. Posteriormente, ocorre o aparecimento das fibrilas que se aglomeram formando as placas senis. Cabe lembrar que dados recentes da literatura sugerem a existência de outras vias de formação de placas senis (CREWS e MASLIAH, 2010).

Os emaranhados neurofibrilares são acúmulos de filamentos pareados helicoidais de proteína TAU hiperfosforiladas no espaço citoplasmático de células mortas. Esse tipo de morte celular parece ocorrer pela hiperfosforilação da proteína TAU, proteína presente no citoesqueleto de neurônios. Essa hiperfosforilação tende a desestruturar o citoesqueleto desses neurônios. Essa desestruturação se dá por meio de alterações estruturais em proteínas do citoesqueleto como a Tubulina e a própria TAU. Ocasionalmente assim a morte destes neurônios e o aparecimento dos emaranhados neurofibrilares. Esse processo parece ocorrer após o acúmulo de peptídeo BA sendo regulado pelas concentrações desse peptídeo (BARTEN e ALBRIGHT, 2008). As alterações decorrentes da hiperfosforilação da TAU parecem também regular e ser reguladas por alterações em proteínas relacionadas à formação de sinapses como *Arc* e Sinapsina (CREWS e MASLIAH, 2010).

A diminuição de volume encefálico ocorre na doença de Alzheimer devido aos processos de morte neuronal ocasionados pelo acúmulo de peptídeo BA e/ou pela hiperfosforilação da TAU. Cabe aqui ressaltar que a perda de comunicações sinápticas é o marcador biológico que melhor se correlaciona com os declínios cognitivos apresentados pelos pacientes com DA (PALOP e MUCKE, 2010).

O peptídeo BA tem sido considerado um dos, senão o principal, responsável pelos processos de morte neuronal e consequente declínio cognitivo dos pacientes com DA (CREWS e MASLIAH, 2010). Tendo em vista a complexa dinâmica de formação das placas senis, Klein (2002) sugere a necessidade de um controle e uma padronização dos estados de aglomeração do peptídeo BA. DAHLGREN, MANELLI, *et al.* (2002) foram um dos primeiros a estudar os diferentes graus de toxicidade das diferentes formas de aglomerados de peptídeo BA. Esses autores observaram, através de estudos por MFA, que os oligômeros desse peptídeo são 10 vezes mais neurotóxicos que suas fibrilas e 40 vezes mais tóxicos que sua forma desagregada. STINE *et al.* (1996; 2003) estudaram os estados de aglomeração do peptídeo BA por meio de MFA e formularam uma caracterização consistente desses estados. Nesses estudos os autores observaram que o peptídeo BA em sua forma solúvel monomérica apresenta valor Z em MFA de 1.0 (\pm 0.3) nm. Já os oligômeros desse peptídeo

apresentam valores Z de 2-4 nm, protofibrilas de 5-8 nm, enquanto as fibrilas apresentam valores Z de 10-25 nm (**figura 1**).

Diversas hipóteses tentam explicar os mecanismos moleculares pelos quais o peptídeo BA atua no sistema nervoso central (SNC). Sabe-se que o peptídeo BA é gerado de maneira fisiológica pelo SNC. Acredita-se que o balanço APP/BA interfere ativamente na atividade sináptica dos neurônios. Níveis ideais de APP e BA podem funcionar como um sistema de retroalimentação. Nesses casos a liberação de peptídeo BA ativaria receptores pré-sinápticos colinérgicos do tipo $\alpha 7$ -nAChRs aumentando a probabilidade de liberação de neurotransmissor por exocitose de vesículas sinápticas. Por outro lado, níveis baixos de APP e BA podem significar a redução da atividade pré-sináptica por carência dessa retroalimentação. Já níveis elevados dos mesmos tendem a gerar um efeito de depressão pós-sináptica por dessensibilização e internalização de receptores glutamatérgicos sinápticos do tipo N-metil-D-Aspartado (NMDA) e receptores do tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) (PALOP e MUCKE, 2010). Considerando somente a concentração de BA, LI, JIN, *et al.* (2011) observaram que exposição a oligômeros de BA ocasionavam ocorrência de hiperestimulação de receptores NMDA do subtipo N-metil D-aspartato 2B (NR2B). Receptores esses pós-sinápticos, porém localizados em regiões externas a fenda sináptica. As alterações citadas acima geram a ativação de vias relacionadas à ocorrência de um fenômeno eletrofisiológico denominado *long term depression* (LTD), como vias que incluem Proteína Fosfatase do tipo 2 B (PP2B) e Glicogênio Sintase Cinase 3 Beta (GSK-3 β) (PALOP e MUCKE, 2010; LI, JIN, *et al.*, 2011). Dados recentes da eletrofisiologia, obtidos em fatias de hipocampo, mostram uma diminuição da atividade dos circuitos glutamatérgicos associada a uma alta concentração de oligômeros de BA e corroboram com a importância dos receptores NMDA, com subunidade NR2B, no mecanismo de ação desses oligômeros (RAMMES, HASENJÄGER, *et al.*, 2011). Sabe-se que apenas algumas horas de exposição a oligômeros de BA ocasionam um acúmulo de glutamato extracelular devido a uma inibição de sua recaptação. Esse desequilíbrio na renovação desse neurotransmissor parece contribuir ativamente na formação de LTD pela presença

de BA (LI, HONG, *et al.*, 2009; BRITO-MOREIRA, PAULA-LIMA, *et al.*, 2011).

Além disto, sabe-se que a glutamina sintetase é uma enzima expressa em astrocitos, responsável pela metabolização do glutamato, o qual é capturado da fenda sináptica por transportadores presentes nos astrocitos como o Transportador de glutamato do tipo 1 em associação com o Transportador de Aminoácidos Excitatório do tipo 2 (GLT-1/EAAT2). O produto dessa reação é a glutamina que, liberada dos astrocitos, serve de substrato, nos neurônios, para a síntese de mais glutamato. Foi observado em modelo genético da DA uma diminuição do número de astrocitos positivamente marcados para a enzima glutamina sintetase assim como uma diminuição na concentração total dessa enzima. Essas alterações apresentaram correlação com a presença de BA (OLABARRIA, NORISTANI, *et al.*, 2011). Além disso, a presença de BA é capaz de gerar um aumento no número de transportadores GLT-1/EAAT2, aumentando a captura de glutamato da fenda sináptica (RODRIGUEZ-KERN, GEGELASHVILI, *et al.*, 2003). Combinados, esses dois efeitos podem contribuir para inibição do sistema glutamatérgico presente na DA.

O sistema GABAérgico também parece sofrer alterações associadas à altas concentrações de BA. Modelos animais genéticos da DA apresentam uma hipoatividade desse sistema de neurotransmissão (PALOP e MUCKE, 2010; KRANTIC, ISORCE, *et al.*, 2012). Sabe-se ainda que a presença de oligômeros de BA em meio de cultura é capaz de ocasionar morte de neurônios GABAérgicos (KRANTIC, ISORCE, *et al.*, 2012). PALOP e MUCKE (2010) sugerem que as alterações GABAérgicas observadas na DA possuem alta relevância, quando estudamos a atividade da rede neural como um todo, principalmente em situações de aprendizado/memória. Essa hipótese foi levantada por esses autores com base em dados de volume e atividade metabólica de regiões corticais de pacientes com DA. Foi observado que em situação de aprendizado/memória os pacientes com DA apresentavam um aumento exacerbado na atividade de regiões corticais relacionadas à tarefa aprendida quando comparados com o aumento de atividade dos controles, sugerindo assim a presença de uma hipoatividade do sistema GABAérgico (SPERLING, LAVIOLETTE, *et al.*, 2009).

Além das alterações funcionais citadas acima a DA é capaz de gerar alterações estruturais no SNC. Modelos genéticos da DA apresentam decréscimo de células oligodendrocíticas progenitoras e maduras, assim como decréscimo da mielinização (DESAI, MASTRANGELO, *et al.*, 2010; DESAI, GUERCIO, *et al.*, 2011). Dados recentes publicados por HORIUCHI, MAEZAWA, *et al.* (2012) mostram que os oligômeros de BA são citotóxicos para oligodendrócitos maduros e impedem a formação das camadas de mielina em torno dos axônios. De maneira interessante foi observado que a proteína básica da mielina (MBP) interage diretamente com o peptídeo BA retardando a formação de fibrilas de BA (LIAO, HOOS, *et al.*, 2010).

Outros aspectos importantes para a compreensão da DA e em especial dos efeitos do acúmulo de BA são os aspectos neuroinflamatórios. Em estudos sobre a DA já foram descritas a ocorrência de astrogliose, microgliose, elevação de concentração de citocinas, mudanças em proteínas de fase aguda, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e eventos de angiogênese (RYU e MCLARNON, 2008; WALSH e SELKOE, 2004; WYSS-CORAY, 2006).

Dentre as citocinas alteradas na DA talvez uma das mais estudadas seja o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α). Sabe-se que o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória capaz de aumentar a permeabilidade endotelial, ativar a produção de proteínas de fase aguda ajudando a conter infecções locais (JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2001). A injeção de BA no hipocampo acarreta um aumento na produção de TNF- α principalmente pelas células microgлияis (RYU e MCLARNON, 2008). Esse aumento de TNF- α parece ser um dos substratos biológicos associados aos déficits cognitivos ocasionados por processos neuroinflamatórios, uma vez que a inativação desta citocina, por modelo farmacológico ou genético, é capaz de atenuar esses déficits (MEDEIROS, S., *et al.*, 2007; BELARBI, JOPSON, *et al.*, 2012). Foi observado ainda que o TNF- α é capaz de aumentar a expressão superficial de receptores AMPA glutamérgicos e gerar internalização de receptores GABAérgicos. Essas alterações neuroquímicas podem ser responsáveis pelos eventos de excitotoxicidade observado em doenças com componentes neuroinflamatórios (STELLWAGEN, BEATTIE, *et al.*, 2005). Com relação à forma oligomérica do peptídeo BA, PAN, ZHU, *et al.*

(2011) observaram que o oligômero de BA ocasiona um aumento na concentração de TNF- α , além de diminuir o *clearance* da forma fibrilar desse peptídeo.

Os mesmo autores citados no parágrafo acima observaram ainda um aumento em outra citocina próinflamatória devido à presença de oligômeros de BA, a interleucina 1 beta (IL-1 β). Dados obtidos em estudo com cultura de astrocitos indicam que esse tipo de célula do SNC pode desempenhar um papel importante na elevação de IL-1 β ocasionada pelos oligômeros de BA (HOU, LIU, *et al.*, 2011). Sabe-se que a IL-1 β é uma citocina próinflamatória capaz de ativar células endoteliais dos vasos, gerarem febre, facilitar o acesso de células efetoras do sistema imune e ativar linfócitos (JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2001). Em modelo animal foi observado que o aumento de IL-1 β ocasiona déficits de aprendizado e que seu bloqueio pode reverter déficits cognitivos ocasionados por estímulos inflamatórios (GIBERTINI, NEWTON, *et al.*, 1995).

Assim como o TNF- α e a IL-1 β a interleucina 6 (IL-6) inicia a chamada resposta de fase aguda do sistema imunológico. Além de atuar na resposta de fase aguda a IL-6 é agente pirógeno e auxilia na ativação de células B (JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2001). A exposição de neurônios hipocâmpais a IL-6 ocasiona o aumento da fosforização anômala da proteína TAU por aumento da atividade da cinase dependente de ciclina 5 (Cdk5) (QUINTANILLA, ORELLANA, *et al.*, 2004). Com relação à presença de oligômeros, foi mostrado que oligômeros de BA geram aumento na liberação de IL-6. Esse aumento é significativamente maior que o aumento ocasionado pelas fibrilas, desse mesmo peptídeo (SONDAG, DHAWAN e COMBS, 2009).

Para melhor entendermos as respostas neuroimunes relacionada à DA, através do estudo de citocinas relacionadas aos processos inflamatórios, é de suma importância considerar também as citocinas antiinflamatórias. A produção de IL10 promove a divisão celular de linfócitos B1, aumenta a expressão de receptores do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe dois em linfócitos B, inibe a produção de outras citocinas como o TNF- α e altera o estado de ativação de macrófagos, inibindo assim a resposta inflamatória (JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2001). Pacientes com DA apresentam menos monócitos capazes de produzir IL-10 do que

indivíduos controle (SARESELLA, CALABRESE, *et al.*, 2011). Já foram mostradas correlações entre polimorfismos que alteram a produção de IL10 e a ocorrência de DA (RIBIZZI, FIORDORO, *et al.*, 2010). Em modelo transgênico da DA foi observado acúmulo de populações de astrocitos em torno de fibrilas e formas difusas de peptídeo BA. Esses astrocitos foram positivamente marcados para IL-10, IL-1 β e Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (APELT e SCHLIEBS, 2001). Contudo a literatura ainda carece de informações sobre a relação entre citocina IL-10 e a DA, especialmente sobre o papel desempenhado pelo peptídeo BA. Estudando animais *knockout* para IL-10 RICHWINE *et al.* (2009) observaram que após um estímulo inflamatório com lipossacarídeos de bactéria (LPS) esses animais apresentavam uma maior produção de citocinas proinamatórias e déficit cognitivo.

É importante que não tratemos processo inflamatório como sinônimo para resposta imunológica. Como proposto por ZIV e SCHWARTZ (2008) o processo inflamatório pode ser considerado um distúrbio na atividade do sistema imunológico e não sua única função. O sistema imune contribui ativamente para o bom funcionamento do SNC, mesmo em condições fisiológicas. Alterações no funcionamento “normal” do sistema imune como as geradas pelo acúmulo de BA ou as observadas em indivíduos imunodeficientes pode acarretar prejuízos no funcionamento do SNC. As células da glia, células de controle de homeostase e defesa do SNC, teriam papel fundamental na relação entre sistema imune e o SNC (ZIV e SCHWARTZ, 2008). Se considerarmos, por exemplo, a citocina TNF- α , como já citado acima, sabemos que ela é capaz de gerar um processo inflamatório e que esse pode ter efeitos deletérios para o funcionamento do SNC (RYU e MCLARNON, 2008; MEDEIROS, S., *et al.*, 2007). Contudo o TNF- α parece possuir também um papel fisiológico no organismo. BEATTIE, STELLWAGEN, *et al.* (2002) observaram que uma liberação “basal” de TNF- α pode facilitar a comunicação sináptica por ocasionar um aumento na expressão de receptores AMPA em neurônios pós-sinápticos. Outros autores mostraram que após estimulação prolongada de um neurônio, o TNF- α promove um aumento de correntes originadas de receptores NMDA e AMPA, porém sem alterar os eventos de *long term potentiation* (LTP) e LTD. Essa citocina atuaria

alterando uniformemente a força de todas as comunicações sinápticas de um neurônio, que envolve receptores do tipo NMDA e AMPA, como consequência da estimulação prolongada (STELLWAGEN e MALENKA, 2006).

Mesmo a IL-1 β parece ter um papel fisiológico em processos cognitivos. O bloqueio de receptores para essa citocina prejudica a memória de uma tarefa aprendida previamente. Já a injeção dessa citocina, pós treinamento, aumenta a memória da tarefa (YIRMIYA, WINOCUR e GOSHEN, 2002). Com base em dados de eletroencefalograma e injeção exógena de IL-1 β e TNF- α em animais KRUEGER (2008) propôs a existência de um mecanismo de controle das vias neurais que serão ativadas durante o sono com participação dessas citocinas. A ativação de determinados neurônios durante o período de vigília aumentaria a liberação de ATP por esses neurônios. Ativando receptores das vias da purina P2 em células gliais vizinhas, esse aumento de ATP geraria um aumento de produção de TNF- α e IL-1 β . As concentrações dessas citocinas poderiam assim servir como marcador biológico que facilitaria a ativação das vias corretas durante o sono. Por regulação dessa atividade, tanto TNF- α quanto IL-1 β passariam a representar papéis importantes na consolidação de informações aprendidas durante a vigília. Contudo cabe aqui ressaltar que a grande maioria dos artigos na literatura relata efeitos deletérios da citocina IL-1 β em tarefas de aprendizado (OITZL, *et al.*, 1993; GIBERTINI, NEWTON, *et al.*, 1995).

As informações apresentadas acima nos mostram que a DA acarreta alterações na produção de citocinas que parecem também estarem envolvidas nos processos de aprendizado e memória. Parece lógico pensar que em uma doença neurodegenerativa, com sintomas de déficits cognitivos, como a DA, altera-se as mesmas moléculas que participam dos mecanismos biológicos de aprendizado e memória. Esse é o caso também se consideramos os sistemas de neurotransmissão GABAérgico e glutamérgico. Ambos sofrem alterações devido a DA, como citado no começo do texto, e são substratos biológicos para o aprendizado e a memória (RAHN, SLUSHER e KAPLIN, 2012; MOLNÁR, 2011; STANLEY, WILSON e FADEL, 2012; YU, QIAN, *et al.*, 2011; BRICKLEY e MODY, 2012; GONZALEZ-BURGOS, FISH e LEWIS, 2011). Da mesma maneira a

mielina sofre alterações na DA, como já citado, e é constantemente remodelada pelos processos de aprendizagem e memória (FIELDS, 2010).

Nesse sentido devemos também nos questionar quais seriam os efeitos de eventos de aprendizado e memória na progressão da DA. A teoria da reserva cognitiva defendida por STERN (2009) postula que pacientes que exercitaram mais o cérebro durante a vida apresentariam menos sintomas de disfunções cognitivas ao desenvolverem a DA, mantendo assim a qualidade de vida do paciente por um tempo mais prolongado. É importante entendermos que o esforço mental prévio não é capaz de prevenir o aparecimento da DA e que também não é capaz de adiar a morte do paciente. Contudo ocorre um atraso no aparecimento dos sintomas das disfunções cognitivas da doença. A **figura 2** adaptada do artigo de STERN (2009) mostra um gráfico hipotético de como funcionaria o mecanismo de reserva cognitiva. Além dos pontos já citados é importante entendermos no gráfico que a presença de uma reserva cognitiva atrasaria o diagnóstico de demência, representado pela linha pontilhada no gráfico, deslocando o diagnóstico para estágios mais evoluídos da doença. Além disso, uma vez que a DA começa a afetar a cognição de um paciente de alta reserva cognitiva, ponto de inflexão no gráfico, sua progressão seria mais rápida.

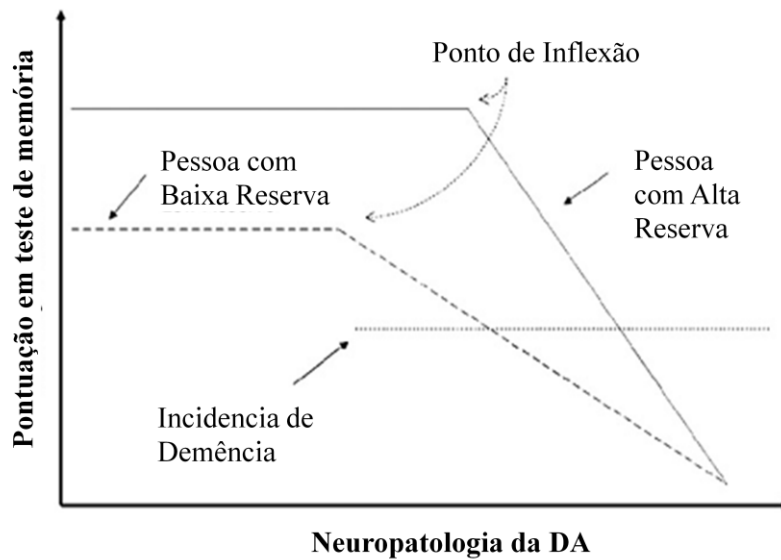


Figura 2- Ilustração teórica de como a reserva cognitiva pode mediar a interação entre a DA e sua expressão clínica. A progressão dos aspectos neuropatológicos da DA está representada no eixo X, enquanto a pontuação dos pacientes em teste de memória está representada no eixo Y. É importante ressaltar que o ponto de inflexão quando a memória começa a ser afetada pela DA é tardio nos pacientes de alta reserva. Os mesmos pacientes receberam o diagnóstico de demência após uma maior progressão da doença. Contudo, passado o ponto de inflexão a doença irá progredir mais rápido nesses pacientes. Adaptado do artigo de STERN (2009).

De acordo com STERN (2009) os mecanismos de reserva podem ser classificados em duas classes. Os mecanismos passivos e ativos. Os mecanismos passivos, também chamados de reserva cerebral, incluem aumento de volume do encéfalo, aumento no número de sinapses e/ou espículas dendríticas. A reserva passiva corresponderia assim a situações nas quais o aumento da rede neural permitiria que a mesma suportasse insultos por mais tempo, retardando o aparecimento de sintomas clínicos. Já os mecanismos ativos, definidos por STERN (2009) como o conceito real de reserva cognitiva, seriam às diferenças individuais em como as pessoas processam informações. Diferenças essas que permitiria algumas pessoas a lidarem por mais tempo com doenças como a DA, sem o aparecimento de sintomas. STERN (2009) subdivide os mecanismos ativos de reserva em reserva neural e compensação neural. Na reserva neural estariam incluídas diferenças de estratégias cognitivas e de redes neurais utilizadas para responder a tarefa. Por exemplo, redes neurais capazes de cumprir a tarefa com maior eficiência ou redes capazes de lidar com uma maior quantidade de informações são consideradas mecanismos ativos de reserva neural. A compensação neural ocorreria quando após injúria o SNC do paciente fosse capaz de recrutar outras redes ou mecanismos para cumprir uma tarefa que anteriormente requisitava os substratos biológicos lesionados pela injúria.

Modelos animais em experimentos que se propõem a estudar reserva cerebral e reserva cognitiva, geralmente utilizam enriquecimento ambiental (EA). Apesar de variar bastante na literatura com relação aos tipos e tempos de estimulação todos os modelos de EA incluem aumento na atividade motora, estimulação sensorial e estimulação cognitiva. Já foi observado que a estimulação com EA previne o aparecimento dos sinais clínicos em diversos modelos experimentais de doenças neurodegenerativas como a DA, Parkinson e a doença de Huntington. Sabe-se também que o EA é capaz de aumentar a neurogênese, o número de células progenitoras de oligodendrócitos, a plasticidade sináptica, o LTP e diminuir LTD. Além disso, já foram mostradas alterações nas proteínas de vias de sinalização dependentes de atividade sináptica, concentrações de neurotrofinas e alterações nos receptores para diversos neurotransmissores como GABA e

Glutamato (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2009; ZIV e SCHWARTZ, 2008; KOMITOVA, PERFILIEVA, *et al.*, 2006).

Poucos autores estudaram os efeitos da estimulação cognitiva em si. CAO, JIAO, *et al.* (2004) usaram o modelo do Labirinto Aquático de Morris (LAM) para estudar os efeitos da estimulação cognitiva. Comparando os resultados dos efeitos do “enriquecimento” cognitivo com animais que foram obrigados a nadar na piscina pelo mesmo tempo que os animais em treinamento, esse autores perceberam que a tarefa de aprendizado do local da plataforma é capaz de gerar um aumento de vascularização no hipocampo dos animais, de forma significativamente maior quando comparado aos animais que só passaram pelo exercício físico e/ou o estresse que também estão envolvidos na tarefa do LAM. Esse processo de angiogênese oriundo do esforço cognitivo parece depender do aumento na produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Utilizando o mesmo desenho experimental, porém com alguns dias a mais de treinamento, ENGMANN, HORTOBÁGYI, *et al.* (2011) observaram um aumento do peptídeo p25 no cérebro de animais treinados. Esse aumento na produção do peptídeo, gerado pelo aprendizado da tarefa, foi diferente das alterações geradas pelo exercício físico e/ou estresse envolvidos na tarefa do LAM. O peptídeo p25 gera a ativação da Cdk5, cinase essa que, como já citado anteriormente, parece estar envolvida na fosforilação da proteína *tau*. Contudo esses autores defendem a hipótese que esse aumento de p25 pode ser um substrato biológico para o aprendizado e memória envolvidos na tarefa. O treinamento prévio no LAM é capaz de gerar alterações que facilitam o reaprendizado da tarefa, mesmo 12 meses depois do primeiro treinamento. Isso pode significar uma melhora na capacidade cognitiva do animal envelhecido devido a sua estimulação em fase jovem (MILGRAM, SIWAK-TAPP, *et al.*, 2006). Contudo somente a estimulação previa com objetos novos ou exercício físico não foram capazes de alterar a cognição dos animais. Cabe aqui ressaltar que existem diferentes tipos de exercício físico e aqueles que envolvem o aprendizado de uma nova habilidade motora parecem ter maiores efeitos benéficos na cognição do animal (MILGRAM, SIWAK-TAPP, *et al.*, 2006). Em estudo prévio (PIRES, C., *et al.*, 2005) nosso grupo mostrou que existem diferenças

quanto ao envolvimento do sistema de neurotransmissão colinérgica, quando se compara animais que aprenderam a tarefa de navegação espacial pela primeira vez, com animais que foram submetidos a um treino prévio. Esses dados indicam que existem diferenças nos substratos neurobiológicos, quando se compara animais pretreinados com animais que estão aprendendo a tarefa cognitiva pela primeira vez. Porém ainda existem poucos dados provenientes de estudos sistemáticos que possam explicar os mecanismos envolvidos no “enriquecimento” cognitivo e como esses se relacionam com as teorias de reserva cerebral e cognitiva.

Com base nas informações citadas acima, no presente estudo levantamos algumas questões relacionadas aos efeitos do treinamento no LAM associado ou não à injeção hipocampal de oligômeros de BA sobre a liberação de neurotransmissores, a produção de citocinas envolvidas no processo inflamatório e a presença de fibras mielinizadas no hipocampo.

Objetivos

Geral

Estudar os efeitos do treinamento espacial intensivo e alta concentração de β A hipocampal, associados ou não, sobre a memória espacial e parâmetros neuroquímicos, inflamatórios e morfológicos e as correlações entre esses.

Específicos

Em ratos submetidos a treinos intensivos no Labirinto Aquático de Morris associado ou não à injeção intra-hipocampal de oligômeros do peptídeo β A avaliar:

- (i) as concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no hipocampo;
- (ii) as liberações de Glutamato e GABA por células hipocampais, em condições normal ou estimulada;
- (iii) qualitativa e quantitativamente, a mielina nas células do Giro Denteado;
- (iv) qualitativa e quantitativamente, a área de núcleo de células do Giro Denteado;
- (v) a memória da tarefa aprendida no LAM;
- (vi) as correlações entre os parâmetros biológicos e entre os aspectos comportamentais

Objetivos Controles Laterais

Avaliar os seguintes efeitos:

- (i) da cirurgia de estereotaxia sobre aspectos biológicos;
- (ii) da tarefa no LAM com e sem o componente cognitivo sobre aspectos biológicos e comportamentais.

Materiais e Métodos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, com o número de protocolo 89/2009, no dia 26/05/2010.

Delineamento Experimental

O experimento foi realizado com ratos machos Wistar (total de 65 ratos) de 2 à 3 meses, provenientes do Centro de Biotérismo do Instituto de Ciências Biológicas (CeBio-ICB). Primeiramente os animais foram divididos em três grupos:

- C** (n=29) Controle: animais *não treinados* na tarefa espacial no LAM.
- T** (n=24) Treino: animais *treinados* na tarefa espacial no LAM.
- CT** (n=12) Controle Treino: animais submetidos somente à natação no LAM, por tempo equivalente ao dos animais do grupo C, sem envolver a execução da tarefa cognitiva. Foram submetidos à cirurgia estereotáxica e receberam injeções de **veículo**.

Detalhes dos procedimentos empregados no treino dos animais (grupo T) e controle do treino (grupo CT) no LAM estão descritos abaixo no item “Tarefa no Labirinto Aquático de Morris”.

Após esse procedimento os animais do grupo C e T foram subdivididos em cinco grupos:

- (ι)**CC** (n=9) Controle Cirurgia: animais *não treinados* e *sem cirurgia* estereotáxica;
- (ιι)**C**(n=10) Controle: animais *não treinados* que serão submetidos à injeção intra-hipocampal de **veículo**;
- (ιιι)**B** (n=10) Beta: animais *não treinados* que serão submetidos à injeção intra-hipocampal de **peptídeo BA** oligomerizado;
- (ιιιι)**T** (n=12) Treino: animais *treinados* no LAM e que serão submetidos à injeção

intra-hipocampal de **veículo**;

(ϖ)**TB** (n=12) Treino Beta: animais *treinados* no LAM e que serão submetidos à injeção intra-hipocampal de **peptídeo BA** oligomerizado;

Os animais submetidos à cirurgia de estereotaxia sofreram canulação bilateral no hipocampo de acordo com as coordenadas do atlas de Paxinos & Watson (1997), conforme detalhado abaixo. A verificação da localização da cânula foi feita por análise macroscópica no momento do sacrifício, como mostrado nas **figuras 3 e 4**. Foi verificado que em todos os animais as cânulas estavam localizadas no lugar correto (hipocampo), contudo 9 animais foram retirados do experimento uma vez que seus capacetes haviam soltado no período de recuperação da cirurgia.

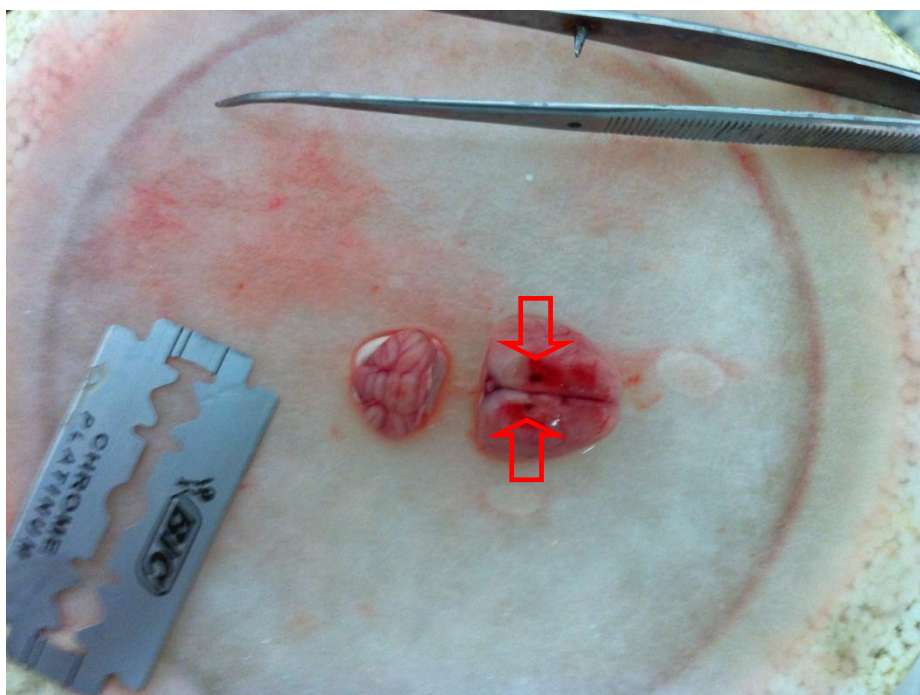


Figura 3 – Foto da vista dorsal de um encéfalo de rato tirada no dia do sacrifício. As setas vermelhas indicam os locais de entrada das cânulas.

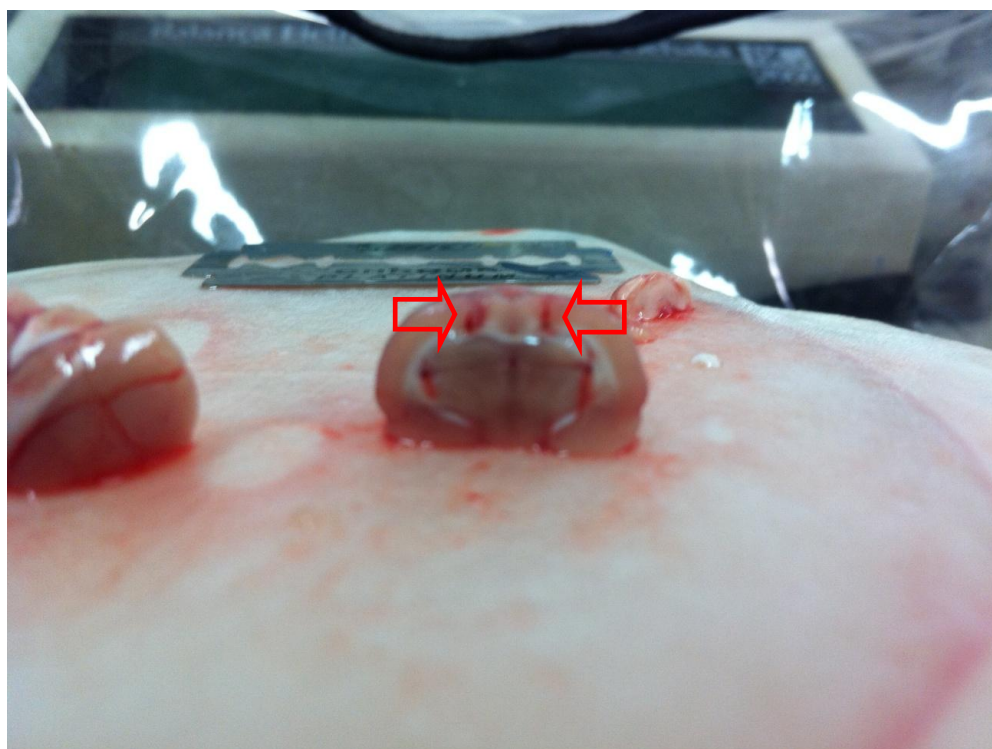


Figura 4 – Foto de um encéfalo de rato tirada no dia do sacrifício, após secção coronal do mesmo. As setas vermelhas indicam os locais de entrada das cânulas. A imagem comprova que as cânulas atingiram o hipocampo do animal.

Os animais foram então submetidos ao teste de memória no LAM¹. Após o teste de memória parte dos animais foram sacrificados, 24h (n=28) ou 48h (n=28) depois do teste. A **figura 5** apresenta um esquema cronológico do delineamento experimental . Todos os animais foram treinados até o 12^a dia de experimento e a memória da tarefa foi avaliada 17 dias depois. Os animais operados nos dias 13 e 14 receberam injeção intrahipocampal de BA no dia 22 e foram sacrificados no dia 30. Já os animais operados nos dias 15 e 16 receberam BA no dia 23 e foram sacrificados no dia 31. Dessa maneira todos os animais tiveram entre 6 a 8 dias de recuperação pós-cirurgia antes da injeção de BA e foram sacrificados no 8^a dia pós injeção.

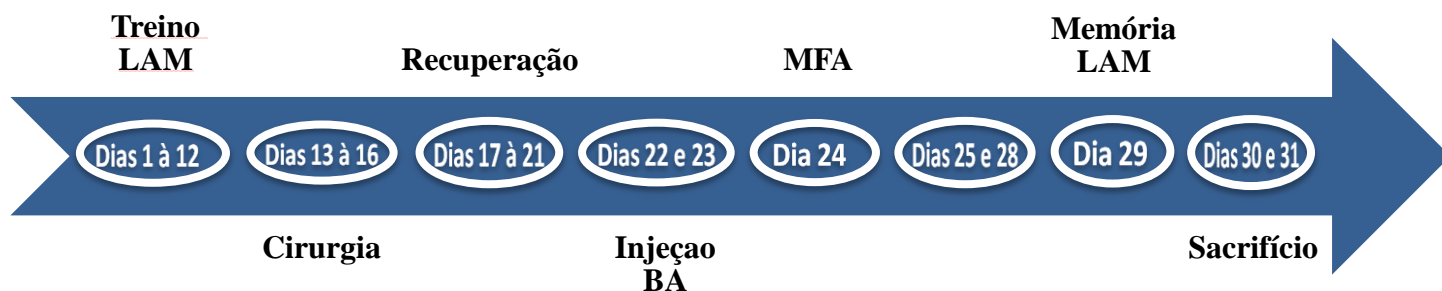


Figura 5 – **Esquema do delineamento Experimental apresentado em linha cronológica.** Dia 1 corresponde ao começo do experimento, dia 31 corresponde ao último dia de sacrifício dos animais. Todos os animais foram treinados até o 12^a dia de experimento e a memória dos animais com relação à tarefa aprendida no treino foi medida 17 dias depois. Os animais operados nos dias 13 e 14 receberam injeção de BA no dia 22 e foram sacrificados no dia 30, enquanto que os operados nos dias 15 e 16 receberam BA no dia 23 e foram sacrificados no dia 31. Dessa maneira todos os animais tiveram entre 6 e 8 dias de recuperação pós cirurgia antes da injeção de BA e foram sacrificados no 8^a dia pós injeção.

Tarefa no Labirinto Aquático de Morris:

A tarefa de navegação espacial no LAM foi realizada como descrito por MORRIS (1984). Os estudos de CLARK, *et al.* (2005) e ENGMANN *et al.* (2011) também foram levados em consideração para elaboração do protocolo de treinamento intensivo .

Equipamento: o labirinto consiste de uma piscina circular de fibra de vidro, com aproximadamente 1,80 m de diâmetro e 43 cm de altura, contendo água a 25°C até o nível de 30 cm. Esta piscina pode ser dividida em quatro quadrantes imaginários denominados NW (noroeste), SW (sudoeste), NE (nordeste) e SE (sudeste). Uma plataforma circular (15 cm de diâmetro) de acrílico foi colocada a 2 cm abaixo do nível da água. Para impedir a localização visual da plataforma, a água foi turvada com a adição de leite em pó. A piscina não possui nenhuma pista, marca ou sinal interno, mas se encontra alocada numa sala de 3 x 3 m, com pistas estáveis visuais extra-labirinto que servem de referência para que o animal localize a plataforma. A localização da plataforma depende da elaboração de um mapa cognitivo espacial do ambiente, no cérebro do animal. Uma câmera de televisão com lente angular foi fixada no teto da sala, bem acima da piscina, para registrar os testes. A coleta dos dados comportamentais foi realizada de forma automatizada, por uma câmera de vídeo posicionada acima da piscina. A análise de imagens foi realizada por um programa executado em Linux, desenvolvido em colaboração, pelo estudante Vitor Purri, do Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Minas Gerais. Os resultados dos testes foram gerados de forma qualitativa e quantitativa. A **figura 6** ilustra uma representação da trajetória de um animal.

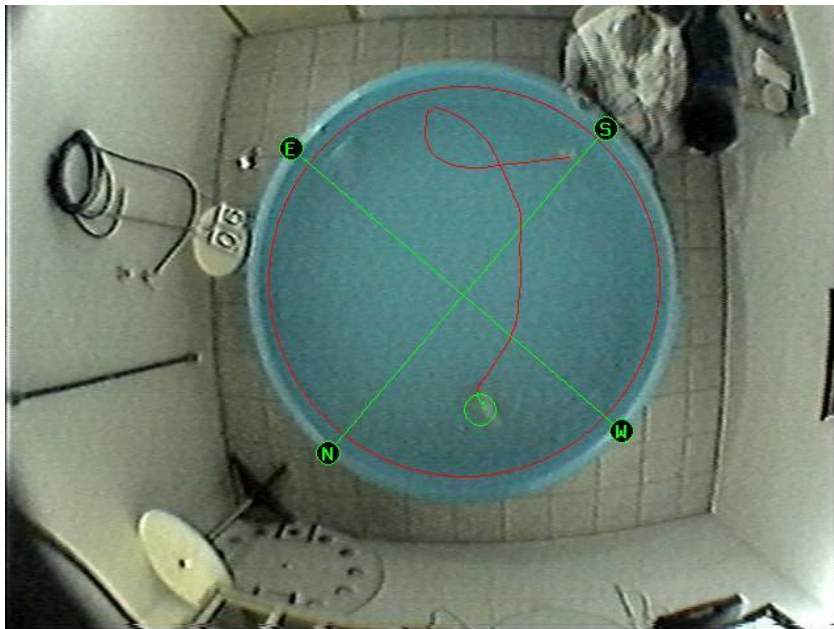


Figura 6 - **Imagem captada pela câmara da sala do Labirinto Aquático de Morris**, ilustrando de forma qualitativa os dados gerados relativos à trajetória do animal em uma tentativa. As posições E, S, N e W estão conectadas entre si pelas linhas verdes formando os quadrantes imaginários da piscina: NW, SW, NE e SE. O círculo vermelho indica os limites internos da piscina e o círculo verde a posição da plataforma submersa a linha vermelha a trajetória percorrida pelo animal.

Treinamento: o **treino** consistiu em uma sessão por dia aplicadas em dez dias consecutivos. Cada sessão foi constituída de 4 tentativas para cada rato, com intervalo intertentativas de aproximadamente 10 minutos e com rodízio dos animais entre as tentativas. Foi dado um intervalo de 2 dias entre a 5ª e a 6ª sessão de treino. Cada tentativa consiste em colocar o animal dentro da piscina, junto á borda, e virado para esta, em um dos quatro quadrantes, aleatoriamente escolhido. A tentativa era finalizada quando o animal encontrava a plataforma ou quando era conduzido até ela caso não a encontrasse no tempo previamente estipulado, no caso 60 segundos. Depois de encontrar ou ser guiado até a plataforma, o animal era deixado sobre a plataforma por 15 segundos. O desempenho dos animais durante o treino foi expresso em (i) latencia (s) = o tempo em que o animal gasta para encontrar a plataforma, (ii) distância percorrida (cm) e (iii) velocidade média de nado. Cada uma dessas variáveis foi expressa através da média \pm erro padrão (EP) das medianas do desempenho dos animais de cada grupo.

Teste de Memória: Ao final da quinta sessão, da décima sessão e 17 dias após a última sessão de treino foram realizados testes de memória para avaliar a memória dos animais com relação a tarefa aprendida durante o treino. Em cada teste de memória, a plataforma foi retirada da piscina e o animal era colocado na piscina e deixado lá por 2 minutos. O desempenho de cada animal no teste de memória foi expresso em (i) tempo gasto no quadrante alvo durante o primeiro minuto, (ii) distância total percorrida (cm) e (iii) velocidade média de nado.

Cirurgia de Estereotaxia

Os animais foram anestesiados com Xilazina [Dopaser, na dose de 10mg/kg, i.p.] e Cetamina [Dopalen, na dose de 75mg/kg, i.p.], em seguida levados a um aparelho estereotáxico [EFF 334 – Insight], onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Antes da exposição da calota craniana, a região foi higienizada com álcool iodado 2%, a pele e o tecido

subcutâneo foram anestesiados com solução de lidocaína a 2% [Alphacaine 100, ~0,1 mL, s.c.]. O periósteo foi retirado, e a calota craniana tratada com H₂O₂ a 3%.

Uma cânula-guia, confeccionada a partir de agulhas de injeção hipodérmica [22G1, 25X0,70 mm], foi implantada bilateralmente e direcionada para o Hipocampo, segundo coordenadas anterior–posterior: -3.6 mm, medial–lateral: -1.9 mm e +1.9mm, dorsoventral: -3.0 mm, a partir do bregma. Essas coordenadas foram determinadas com base no atlas PAXINOS e WATSON (1997).

Depois de implantada, a cânula-guia foi fixada na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável que, por sua vez, foi ancorada por dois parafusos de forniture de aço inoxidável. Ao fim do procedimento cirúrgico, foi administrado, por via intramuscular, o agente antibiotico a base de penicilina Multibiotico. O Multibiotico foi diluido na concentração de 0,43 g/mL e cada animal recebeu uma dose de 0,4mL da solução por kilograma de peso.

Preparo e injeção da solução de oligômeros de beta-amiloide

O peptídeo BA₍₁₋₄₂₎ [Calbiochem Merck] foi agregado em oligômeros segundo protocolo proposto por KLEIN (2002). Resumidamente, 250 µg de peptideo foram diluidas em 55,4 µL de 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) [Merck] e deixados a temperatura ambiente por 1 hora. O HFIP garante que o peptideo esteja em sua forma solúvel, não agregada. Em seguida a solução foi incubada em gelo por 7 min. A solução de peptideo foi então alíquotada (13,85 µL por tubo *Eppendorf*) e permaneceu no tubo aberto 12h em capela de fluxo, para evaporação do HFIP. Após centrifugação a vácuo as alíquotas foram guardadas em freezer -80 °C, até o momento do uso. Um dia antes da injeção as alíquotas foram retiradas do freezer e diluídas em 2,77 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) [QM] e, posteriormente, diluídas com 135,73 µL de meio de cultura Ham F12, sem fenol [Cultilab]. A solução foi então incubada à 5 °C por 24h. Após centrifugação por 10 min à 5°C e 14.000 r.p.m. [Sorvall RC-5B; Rotor Sorvall SS-34, *Du Pont Instruments*] a

solução estava pronta para uso com concentração final de 5mM. Cada animal recebeu uma concentração final de 1000 pmoles de peptídeo, 500 pmoles em cada hemisfério. A dose foi escolhida com base nas observações de GRANIC, et al. (2010). O volume final injetado foi de 4,9 µL por hemisfério em cada animal. Os animais dos grupos T, C e CT receberam injeção do mesmo volume, porém contendo somente o veículo no qual o BA se encontrava diluído, meio de cultura Ham F12 e DMSO. A injeção foi feita com utilização de uma seringa Hamilton de volume total igual à 10 µL. Foram injetados 0,1 µL a cada 12 segundos. Ao final da injeção a agulha de injeção foi deixada *in situ* por 5min para difusão da solução. A mesma solução foi utilizada para à injeção em todos os animais. No terceiro dia após a etapa final de preparo da solução de oligomêros de BA, após os dois dias necessários para injeção dessa solução em todos os animais, a solução de peptídeo foi analisada em MFA para confirmar a presença de oligomeros.

Análise da solução de oligomeros de beta-amilóide em Microscopia de força atômica

A solução de oligômeros de BA, usada no tratamento dos animais, foi analisada em MFA como descrito por STINE, *et al.* (2003). No último dia de injeção 10 µL da solução de oligômeros de BA foram pipetados em placa de mica [Ted Pella – *Highest Grade VI*, 12 mm]. A placa foi então lavada gentilmente com água mili-Q e guardada a 5 °C para análise no dia seguinte. A análise foi feita em MFA Asylum Research (Santa Barbara, CA, EUA - MFP-3D-AS) com sonda Olympus AC240TS, constante de mola (k) (N/m) - 2 (0.5 - 4.4), frequência de ressonância (kHz) - 70 (50 - 90), *Tip radius* (nm) - 9 +/- 2. Foram feitas análises em campos de 10 µm X 10 µm , 5 µm X 5 µm e 2 µm X 2 µm. Os valores de Z observados foram usados para comprovar a existência de oligômeros. Como definido por STINE, *et al.* (2003) valores de Z entre 2 nm e 4 nm foram considerados evidência da presença de oligomêros de BA.

Obtenção das amostras biológicas: Sacrifício dos animais e Dissecação

Um ou dois dias depois dos testes comportamentais os animais foram sacrificados por decapitação. Após decapitação o encéfalo do animal foi rapidamente retirado e dissecado sobre papel absorvente banhado em solução fisiológica Tyrode com baixa concentração de cálcio (meio de repouso) (**tabela 1**), apoiado em placa de Petri sobre o gelo. Foi feito um corte coronal na altura das canulações para verificação da posição correta das cânulas, **figuras 3 e 4**. Um dos hemisférios de metade dos animais de cada grupo foi infundido em solução formalina (fomol 37% 100 mL; água destilada 900 mL; NaH_2PO_4 4 g; Na_2HPO_4 6,5 g) para posterior análise morfológica. Os hemisférios foram escolhidos randomicamente mantendo a mesma proporção de hemisférios esquerdos e direitos. Dos hemisférios restantes foram retirados o hipocampo. Os hipocampos foram fatiados em prismas de 400 μm de comprimento por 400 μm de profundidade em fatiador automático [Brinkmann – *Tissue Chopper* McIlwain]. Aproximadamente 20 mg de tecido hipocampal foram utilizados para dosagem de neurotransmissores, glutamato e GABA, conforme descrito abaixo. O restante, aproximadamente 35 mg, de tecido hipocampal foi utilizado para dosagem de citocinas.

	NORMAL	ESTIMULADO	REPOUSO
NaCL	1,25 mM	1 mM	1,25 mM
KCl	2,5 mM	30 mM	2,5 mM
CaCl ₂	2 mM	2 mM	0,09 mM
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM
NaHCO ₃	25 mM	25 mM	25 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM	3,15 mM
Glicose	0,1 % p/v	0,1 % p/v	0,1 % p/v

Tabela 1 – **Composição das soluções Tyrode** utilizadas nos experimentos para determinação da liberação de neurotransmissores (glutamato e GABA). pH = 7,4

Determinações de Parâmetros Glutamatérgicos e GABAérgicos

No dia do sacrifício duas amostras de hipocampo fatiado, de aproximadamente 10 mg cada, de cada animal foram incubadas por no mínimo 30 min. em 500 µL de meio Tyrode de baixa concentração de cálcio em gelo. Tal incubação objetivou diminuir o metabolismo e evitar a morte das células. A seguir, as amostras foram então incubadas a 37° C em meio Tyrode padrão para reativação das células. Posteriormente, uma das duas amostras de cada animal foi incubadas a 37°C por 5 min em 500 µL de meio Tyrode Normal (condição normal) e a outra em meio Tyrode com alta concentração de KCl (condição estimulada). O tecido foi então retirado e o meio de incubação foi coletado e congelado em freezer -80° C para posterior dosagem das concentrações de GABA e Glutamato, liberados nas condições normal ou na presença de um estímulo despolarizante. A **tabela 1** contem a composição dos 3 subtipos de meio Tyrode utilizados, normal, estimulado (alto teor de KCl) e repouso (baixo teor de CaCl₂).

As determinações de glutamato e GABA nas amostras de sobrenadante foram realizadas por método, estabelecido pelo nosso grupo (FREITAS-SILVA, 2010), de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*=HPLC), conforme detalhado abaixo.

Procedimento de Derivatização: A derivatização foi realizada conforme descrito previamente por MENGERINK et al (2002) e KUTLAN e MOLNAR-PERL, (2003). As amostras de sobrenadantes obtidas acima foram descongeladas no dia do ensaio e foram centrifugadas à 4° C, 10000 r.p.m. durante 15 min [Sorvall RC-5B; Rotor Sorvall SS-34, *Du Pont Instruments*]. O sobrenadante foi retirado e submetido à derivatização para análise cromatográfica em detector fluorimétrico. A derivatização foi preparada misturando 200 µL da amostra ou padrão com 40 µL de solução metanólica de orto-oftaldeído (OPA) (5 mg/mL), 150 µL de tampão borato (pH 9,9) e 5 µL de de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). Após derivatização as concentrações de GABA e

Glutamato foram medidas por HPLC . O sistema de HPLC era constituído de um cromatógrafo [LC-10AD, Tokyo, Japan] com *loop* de 200 µL [Rheodyne 7725-I, California, USA] e um detector fluorimétrico [FLD- Shimadzu *spectrofluorometric detector* RF-551, Tokyo, Japan] acoplados a uma bomba LC-10. O sistema foi equipado com uma coluna analítica C18 [Hibar-Futigsanle RT] de partículas de 3 µm [150mm×4,6 mm, ID] com pré-coluna RT 250-4 E. [Merck]. Para análise dos dados cromatográficos foi utilizado um integrador Shimadzu C-R7Ae *plus*. A fase móvel utilizada era constituída de acetato de sódio 0,05M, tetrahydrofurano 1 % e metanol 49 %, com pH 4,0. Antes do uso a fase móvel era filtrada em filtro Millipore 0,45 µm e sonicada por 20 min. para degaseificação. Os compostos foram eluídos isocraticamente durante corridas de aproximadamente 12 min. com fluxo de 1 mL/min.. O detector de fluorescência foi configurado com excitação de 337 nm e emissão de 454 nm, sensibilidade baixa e *range* de 2X.

Os picos de GABA e Glutamato foram identificados pelo tempo de retenção característico, 8 min e 3 min, respectivamente, determinado por injeção de soluções padrão – curvas padrões - de GABA, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL [Sigma Aldrich, EUA] e de Glutamato, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10 µg/mL [Sigma Aldrich, EUA].

As áreas dos picos encontradas nas amostras foram medidas e comparadas com as áreas obtidas nas respectivas curvas padrões para determinar as concentrações dos neurotransmissores nas amostras. Os valores de GABA e glutamato obtidos estão expressos em (ng/g)/100 e µg/g de tecido, respectivamente.

Parâmetros imunológicos: Dosagem das Citocinas

Para dosagens das concentrações hipocampais de IL-10, IL6, IL-1β e TNF-α foi utilizado o método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sanduíche. As amostras foram pesadas e colocadas em solução inibidora de proteases para extração de citocinas, em proporção de 1 mL / 100 g de tecido [NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05 %; Albumina de soro bovino 0,5 %; Fluoreto de

fenilmetilsufonila 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; Ácido etilenodiamino tetra-acético 10 mM; 20 UI de aprotinina], preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e Na₂HPO₄.12H₂O 2,89 g diluídos em 1 litro). As amostras foram maceradas em um homogenizador de tecidos [Power Gen 125, Fisher Scientific Pennsylvania, EUA] e a solução resultante foi centrifugada a 10.000 r.p.m., a 4 °C, por 10 minutos [Centrífuga BR4 e Rotor AB 2.14, Jouan, Winchester, VA, EUA]. O sobrenadante foi recolhido. Os *kits* para ELISA de citocinas de rato foram obtidos da R&D Systems [DuoSet] e utilizados de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços [C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA].

As concentrações das citocinas foram avaliadas em diluição 1:3 em solução tampão de fosfato contendo 1 % de soro albumina bovina. Em cada placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de solução/poço na concentração adequada, indicada pelo fabricante, do anticorpo de captura específico (anticorpo primário) para IL1, ou IL6 ou IL10 ou TNF-alfa. Esta solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h a 4 °C e foi lavada 5 vezes com tampão fosfato/Tween 0,1 % em um lavador de placas automático. Logo após, foram adicionados 200 µL de solução de bloqueio (tampão fosfato-1% e Soro albumina bovina). O tempo de bloqueio foi de duas horas. Foram adicionados 50 µL das amostras e os padrões de citocinas a partir de concentrações decrescentes para estabelecimento das respectivas curvas padrões (as concentrações dos padrões de cada citocina foram de acordo com os fabricantes). As placas foram incubadas por mais 18 h a 4 °C. Foram adicionados então, 100 µL de uma solução de anticorpo de detecção (anticorpos secundários) em cada poço da placa. A placa foi incubada por uma hora. Transcorrido este período e após lavagem, foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase [Pharmingen]. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e depois foi adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina [Sigma] e H₂O₂ [Merck]. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. O produto de oxidação da o-fenilenodiamina foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (492 nm) [Molecular Devices, USA].

Estudos Morfológicos: Preparo das Lâminas

Após secção coronal na altura da canulação, um hemisfério de metade dos animais de todos os grupos, foi infundido em solução de formalina por 24 h em agitação. Após incubação, o tecido foi processado em parafina. Os blocos resultantes foram fatiados em micrótomo em cortes de 6 µm de espessura. Os cortes foram aderidos às lâminas com gelatina especial e utilizados para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e com *Luxol Fast Blue*, para análise da área total de núcleos das células e de mielina, respectivamente.

Análise da mielina do Giro Denteado do hipocampal

A técnica de histoquímica *Luxol Fast Blue* foi utilizada para marcar mielina nos cortes de tecido hipocampal. As lâminas foram desparafinizadas com dois banhos em Xilol, 30 min cada. Os cortes foram então hidratados em dois banhos em álcool absoluto, 5 min cada, e um banho em álcool 95 % por 5 min. Após hidratação as amostras foram incubadas em *Luxol Fast Blue* [1 g de Luxol; 100 mL de Álcool 95 %; 5 mL de Ácido Acético 10 %] por 3 horas a 60 °C. Para lavar o excesso de corante, as lâminas foram mergulhadas em álcool 95 % e água destilada. Em seguida as mesmas foram mergulhadas em solução de carbonato de lítio 0,05 % (w/v), álcool 70 % e água destilada, repetidas vezes até que o ponto ideal (contraste) da coloração fosse atingido. A lavagem nessas 3 soluções foi interrompida quando o contraste entre o azul da substancia branca e a falta de coloração da substancia cinzenta fosse visualizada em microscópio (10X). Para tal análise o corpo caloso e o córtex, presentes nas lâminas, foram usados como referência. As amostras foram então mergulhadas em álcool 70 %, incubadas em solução aquosa de Eosina 5% (w/v) por 1 min e lavadas em água destilada. Após lavagem as lâminas foram incubadas em solução de Cresil Violeta [0,25 g de Cresil Violeta; 100 mL de água destilada; 1 mL de ácido acético 10%] por 10 seg, lavadas em

água destilada e desidratadas por banho em gradiente crescente de álcool (95 %, absoluto e absoluto novamente). Por fim as lâminas ficaram incubadas em estufa a 60 °C por 10 min para secar os cortes e, posteriormente, as laminas foram montadas com fixador Entellan e lamínula. Para análise morfológica foram retiradas 5 fotos de cada lamina/animal, na região do Giro Denteado do hipocampo no aumento de 40 X. A análise foi feita de maneira automática pelo programa KS300 e foram obtidas as áreas totais e luxol positivas, valores expressados em μm^2 .

Análise da área de núcleo de células do Giro Denteado do hipocampo

A análise de áreas de núcleos celulares na região do giro denteado foi realizada como medida indireta do número de células e do estado metabólico dessas células. Para tal análise foi utilizada a técnica de coloração histoquímica HE. Em resumo, as lâminas contendo cortes de 6 μm de espessura foram banhadas em Xilol 3 X por 15 min para desparafinização. Posteriormente, as lâminas foram banhadas em álcool 95 % por 20 min. e lavadas em água corrente. Os cortes foram então incubados em solução de Hematoxilina [Hematoxilina 5 g; álcool 95 % 100 mL; Sulfato de alumínio e amônio 20g; Água destilada 1000 mL; Ácido Acético 3 mL; Oxido de Mercúrio 3 g] por 1 min e em seguida lavados em água corrente. O material foi, então, incubado em solução aquosa de Eosina 5% (w/v) por 1 min e lavado em água corrente. O excesso de corante foi então retirado com banho em álcool 99,5 % e o material foi então diafanizado em xilol. Posteriormente, as laminas foram montadas com fixador Entellan e lamínula. Para análise morfológica foram retiradas aproximadamente 6 fotos de cada lamina/animal, na região do Giro Denteado do hipocampo no aumento de 40 X. A análise foi feita de maneira automática pelo programa KS300 e foram obtidas as áreas totais celulares e hematoxilina positivas, valores expressados em μm^2 .

Análise estatística

A distribuição normal de todos os dados obtidos no presente trabalho foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$ para distribuição normal). O nível de significância considerado, em todos os testes, foi de 5%. O número de animais de cada grupo utilizado em cada análise encontra-se na sessão resultados na legenda da figura ou tabela referente à análise. Para análise dos dados morfológicos cada foto foi considerada independentemente. Logo o “n” total de cada grupo considerado nas análises estatísticas foi igual ao número de animais no grupo multiplicado pelo número de fotos de cada animal.

Experimentos Controles Laterais

Efeitos da cirurgia estereotáxica: Comparação entre os grupos CC e C. A análise de variância (ANOVA) de uma via, com fator presença ou ausência de cirurgia, foi utilizada para análises dos dados de concentrações de citocinas e morfológicos com distribuição normal. Os dados não paramétricos foram analisados por teste de Mann-Whitney com fator cirurgia.

Parâmetros neuroquímicos foram analisados por ANOVA fatorial (2x2). Os fatores utilizados foram cirurgia (com e sem) e meio de incubação (normal ou estimulado).

Efeitos da tarefa no LAM com e sem o componente cognitivo: Os animais do grupo T foram comparados com os dos grupos CT para avaliar as diferenças entre a exposição ao LAM com ou sem atividade cognitiva (encontrar a plataforma). Dados de citocinas e morfológicos, com distribuição normal, foram analisados por ANOVA de uma via com fator animais treinados ou animais que somente foram expostos à natação no aparato, porém sem treinamento. Parâmetros inflamatórios e morfológicos com distribuição não paramétrica foram estudados por meio do teste

Mann-Whitney, considerando as 2 situações já descritas.

Os dados neuroquímicos foram analisados com teste ANOVA fatorial (2x2) . Os fatores utilizados foram treinamento (com e sem componente cognitivo) e meio de incubação (normal ou estimulado).

Os resultados obtidos nos testes de memória da tarefa aprendida no LAM foram analisados independentemente por testes de ANOVA de uma via ou por teste de Mann-Whitney, considerando o fator treinamento, previamente explicado. Foram analisados o tempo no quadrante alvo durante o primeiro minuto, a velocidade média total e a distancia percorrida durante os testes de memória.

Efeitos do treinamento e/ou injeção de oligômeros de BA:

Os dados obtidos nos experimentos com os grupos C, T, B e TB foram analisados para estudar os efeitos dos tratamentos, treinamento no LAM, injeção de peptídeo BA intra-hipocampal e, possíveis interações entre eles. Para dados morfológicos e imunológicos foi utilizado teste de ANOVA fatorial (2x2) com os fatores treinado ou não treinado e injeção de BA ou não. Dados não paramétricos foram estudados por meio do teste Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla *post hoc* de Dunn.

Os resultados neuroquímicos foram analisados com teste ANOVA fatorial (2x2x2) com fatores treino (com e sem treino), injeção de BA (com e sem BA) e meio de incubação (normal ou estimulado),

Dados do desempenho dos animais no treino – aprendizado - foram avaliados por ANOVA fatorial (2x10) com medidas repetidas no último fator. Os fatores considerados foram injeção ou não de peptídeo BA e sessões de treino no LAM. O desempenho dos animais foi quantificado a partir das medidas da latência (s) e a distância (cm) percorrida para chegar até a plataforma submersa, assim como a velocidade media (cm/s) em cada sessão do treino. Os valores de latência e distância foram obtidos pela mediana da média da latência/distância dos animais de cada grupo

durante as 4 tentativas de cada sessão .

Parâmetros avaliados durante os testes de memória no LAM foram comparados por teste ANOVA de uma via com fator único, injeção ou não de BA. Foram analisados o tempo no quadrante alvo durante o primeiro minuto, a velocidade média de nado e a distancia percorrida durante os testes de memória.

A análise de Regressão Linear Múltipla foi utilizada para avaliar possíveis correlações entre os parâmetros comportamentais, neuroquímicos, imunológicos e morfológicos determinados no presente estudo. Para possibilitar essa análise, foi utilizada a media dos resultados morfológicos obtidos nas fotos de cada animal. Dessa maneira, os dados morfológicos de cada animal passaram a representar somente um valor (para cada animal) na análise. A taxa de estimulação da liberação de neurotransmissores foi obtida, para essa análise, dividindo a liberação do neurotransmissor em meio estimulante pela liberação do mesmo em meio normal. O teste de Durbin-Watson foi usado para averiguar independência entre as variáveis preditoras de cada análise. Valores entre 1 e 3 nesse teste foram considerados como indicadores de independência entre as variáveis preditoras. A independência entre os erros das variáveis preditoras foi acessada pelo fator de inflação da variância (VIF). Os erros foram considerados independentes se o valor de VIF, observado para cada variável preditora, foi menor que 10 e se a media do VIF de todas as variáveis preditoras foi menor que 3. A homogeneidade de distribuição das variáveis preditoras foi analisada por observação visual de gráfico de dispersão como descrito em FIELD (2005).

Resultados

I. *Experimentos Controles Laterais*

I.1 *Efeito da cirurgia de estereotaxia*

Os resultados das análises dos efeitos da cirurgia são apresentados na **tabela 2**. Somente a área de núcleo das células do GD do hipocampo, apresentou diferença significativa entre os grupos com cirurgia (C) e sem cirurgia (CC) ($Z=-2,172$; $p=0,03$), **figura 7**. Nenhum outro parâmetro foi alterado. Como os animais de todos os grupos receberam cirurgia de estereotaxia, o efeito da cirurgia foi considerado irrelevante como fator de interferência nos objetivos do presente estudo. Mais considerações a respeito do aumento de área dos núcleos das células do GD do hipocampo são apresentadas na sessão de Discussão.

Efeitos da Cirurgia de Estereotaxia			
Parâmetro analisado	Teste Estatístico	Valor de significância para comparação entre os grupos	N de amostras por grupo
Glutamato	ANOVA 2x2	0,136	CC = 8; C = 8
GABA	ANOVA 2x2	0,799	CC = 8; C = 8
Fibras de Mielina do GD do hipocampo	Mann-Whitney	0,599	CC = 23; C = 25
Tamanho do Núcleo células do GD do hipocampo	Mann-Whitney	0,030*	CC = 41; C = 54
IL-1 β	Mann-Whitney	0,338	CC = 7; C = 7
TNF- α	ANOVA de uma via	0,092	CC = 9; C = 8
IL-6	Mann-Whitney	0,643	CC = 7; C = 8
IL-10	Mann-Whitney	0,847	CC = 9; C = 8

Tabela 2- **Dado das Análises Estatísticas da comparação entre os grupos de animais com (C) e sem (CC) cirurgia.** Os grupos C e CC apresentaram diferença significativa somente com relação ao tamanho dos núcleos de células do Giro Denteado (GD) do hipocampo , avaliado através da técnica HE ($Z = -2,172$; $p = 0,03$) * = $p < 0,05$

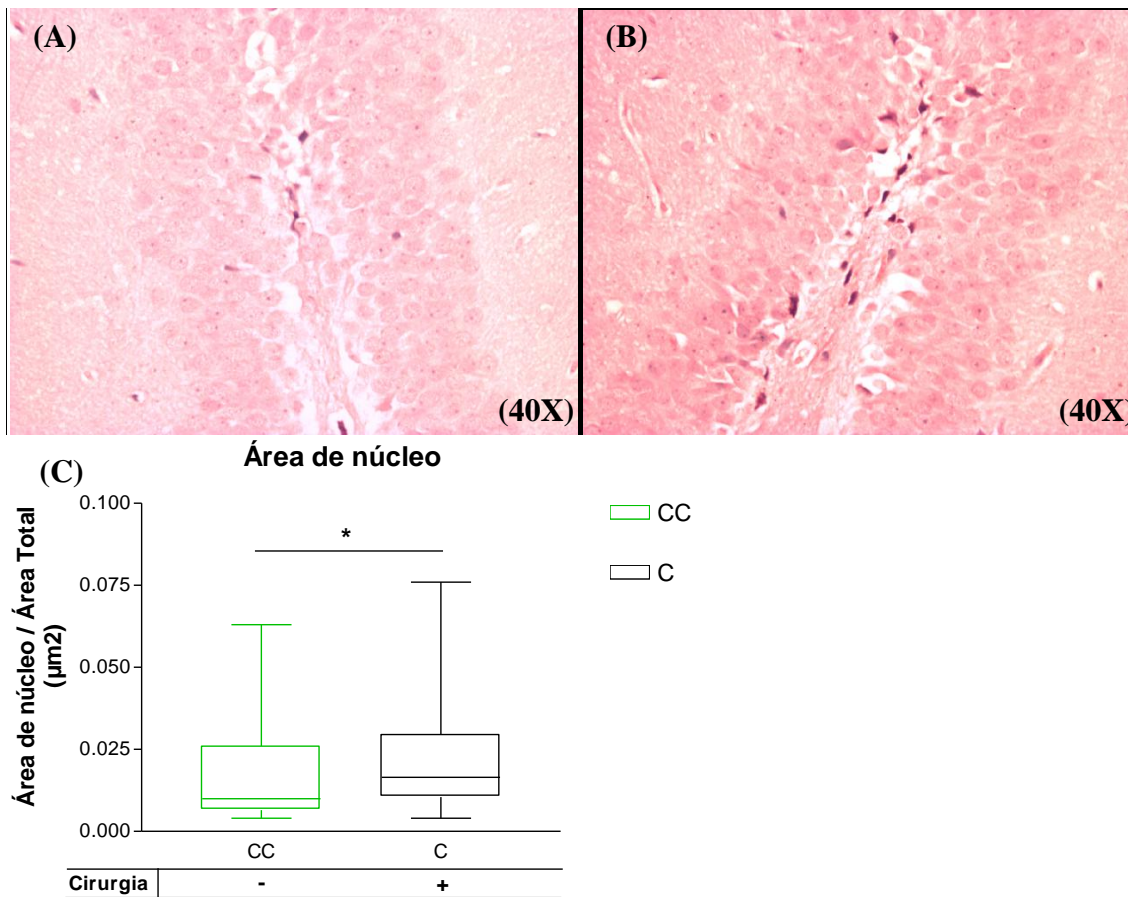


Figura 7 – **Efeito da Cirurgia Estereotaxica sobre o Tamanho de Núcleos de Células do Giro Denteado do Hipocampo.** Painéis A e B: imagens de cortes do hipocampo corados por HE (40X) dos animais dos grupos CC (ControleCirurgia=sem cirurgia; n = 41) e C (Controle=com cirurgia; n = 54), respectivamente. Painel C: dados quantitativos= área de núcleos (µm²) dividido pela área total da imagem (µm²). O *Box plot* mostra os valores máximo e mínimo, mediana e um quartil abaixo e um acima da mediana dos grupos. Foi observado um aumento significativo ($Z = -2,172$; $p = 0,03$) nos animais que passaram pela cirurgia de estereotaxia. * = $p < 0,05$

1.2 Efeito da tarefa no LAM com e sem o componente cognitivo

Para compreendermos melhor as diferenças entre os efeitos biológicos do esforço cognitivo exigido pela tarefa no LAM e simplesmente o exercício físico e/ou estresse envolvidos nessa tarefa, os grupos T e CT foram comparados entre si. Cabe aqui lembrar que os animais do grupo CT foram pareados aos animais do grupo T de tal forma que todos os animais do grupo CT foram obrigados a nadar no aparato do LAM por tempo equivalente aos animais do grupo T, porém sem a presença da plataforma. Dessa maneira, se comparados aos animais do grupo T, eles foram submetidos às mesmas condições de esforço físico e estresse. Os animais dos dois grupos, CT e T foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, portanto, a única diferença entre os dois grupos foi a presença ou não do treino cognitivo. Os dados da análise estatística da comparação entre CT e T, para as variáveis comportamentais e biológicas, estão descritos a seguir e apresentados na **tabela 3**.

Todos os parâmetros medidos nos testes de memória mostraram diferenças significativas entre os grupos T e CT (**figura 8**). Isso inclui o tempo no quadrante no qual estaria a plataforma (quadrante alvo) durante o primeiro minuto do primeiro ($Z=-3,349$; $p=0,001$), segundo ($F=113,017$; $p<0,001$) e terceiro ($Z=-2,849$; $p=0,004$) testes de memória. Foram observadas, também, diferenças significativas, entre os grupos T e CT, nas distâncias percorridas durante o primeiro ($F=7,071$; $p=0,014$), o segundo ($F=18,487$; $p<0,001$) e o terceiro ($F=7,742$; $p=0,012$) teste de memória e na velocidade média no primeiro ($F=7,030$; $p=0,015$), segundo ($F=18,404$; $p<0,001$) e terceiro ($F=7,743$; $p=0,012$) testes. Os animais dos grupos CT apresentaram menor velocidade de nado e percorreram menores distâncias durante os testes de memória.

A área mielinizada no GD do hipocampo dos animais, detectada em coloração por *Luxol Fast Blue*, nos mostra uma diferença significativa entre os grupos T e CT ($F=6,365$; $p=0,016$) (**figura 9**).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos demais parâmetros avaliados (TNF- α , IL1 β , IL6, IL10, área de células do GD e liberações normal ou

estimulada de Glutamato ou GABA), conforme apresentado na **tabela 3**.

Dados estatísticos da comparação entre os grupos T <i>versus</i> CT: efeito do componente cognitivo			
Parâmetro analisado	Teste Estatístico	Valor de significância para comparação entre os grupos	N de amostras por grupo
Tempo no quadrante alvo no 1° min. do 1° teste de memória	Mann-Whitney	0,001*	T = 12; CT = 12
Distância percorrida no 1° teste de memória	ANOVA de uma via	0,014*	T = 12; CT = 12
Velocidade Média durante o 1° teste de memória	ANOVA de uma via	0,015*	T = 12; CT = 12
Tempo no quadrante alvo no 1° min. do 2° teste de memória	ANOVA de uma via	< 0,001*	T = 12; CT = 12
Distância percorrida no 2° teste de memória	ANOVA de uma via	< 0,001*	T = 12; CT = 12
Velocidade Média durante o 2° teste de memória	ANOVA de uma via	< 0,001*	T = 12; CT = 12
Tempo no quadrante alvo no 1° min. do 3° teste de memória	Mann-Whitney	0,004*	T = 11; CT = 9
Distância percorrida no 3° teste de memória	ANOVA de uma via	0,012*	T = 11; CT = 9
Velocidade Média durante o 3° teste de memória	ANOVA de uma via	0,012*	T = 11; CT = 9
Glutamato	ANOVA fatorial (2x2)	0,753	T = 11; CT = 8
GABA	ANOVA fatorial (2x2)	0,756	T = 11; CT = 8
Área Mielinizada (Luxol Fast Blue)	ANOVA de uma via	0,016*	T = 24; CT = 20
Área de núcleos de células hipocâmpais (HE)	Mann-Whitney	0,365	T = 51; CT = 45
IL-1 β	ANOVA de uma via	0,403	T = 11; CT = 9
TNF- α	Mann-Whitney	0,271	T = 11; CT = 9
IL-6	ANOVA de uma via	0,422	T = 11; CT = 8
IL-10	Mann-Whitney	0,305	T = 11; CT = 9

Tabela 3 – Dados da comparação entre o grupo T, animais que receberam treinamento convencional no LAM e CT, animais expostos ao LAM sem executar a tarefa cognitiva. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos T e CT em todos os parâmetros comportamentais quantificados durante os testes de memória. Os dados de mielinização obtidos por meio de coloração com *Luxol* apresentaram diferença significativa ($F = 6,365$; $p = 0,016$) entre os grupos. * = $p < 0,05$

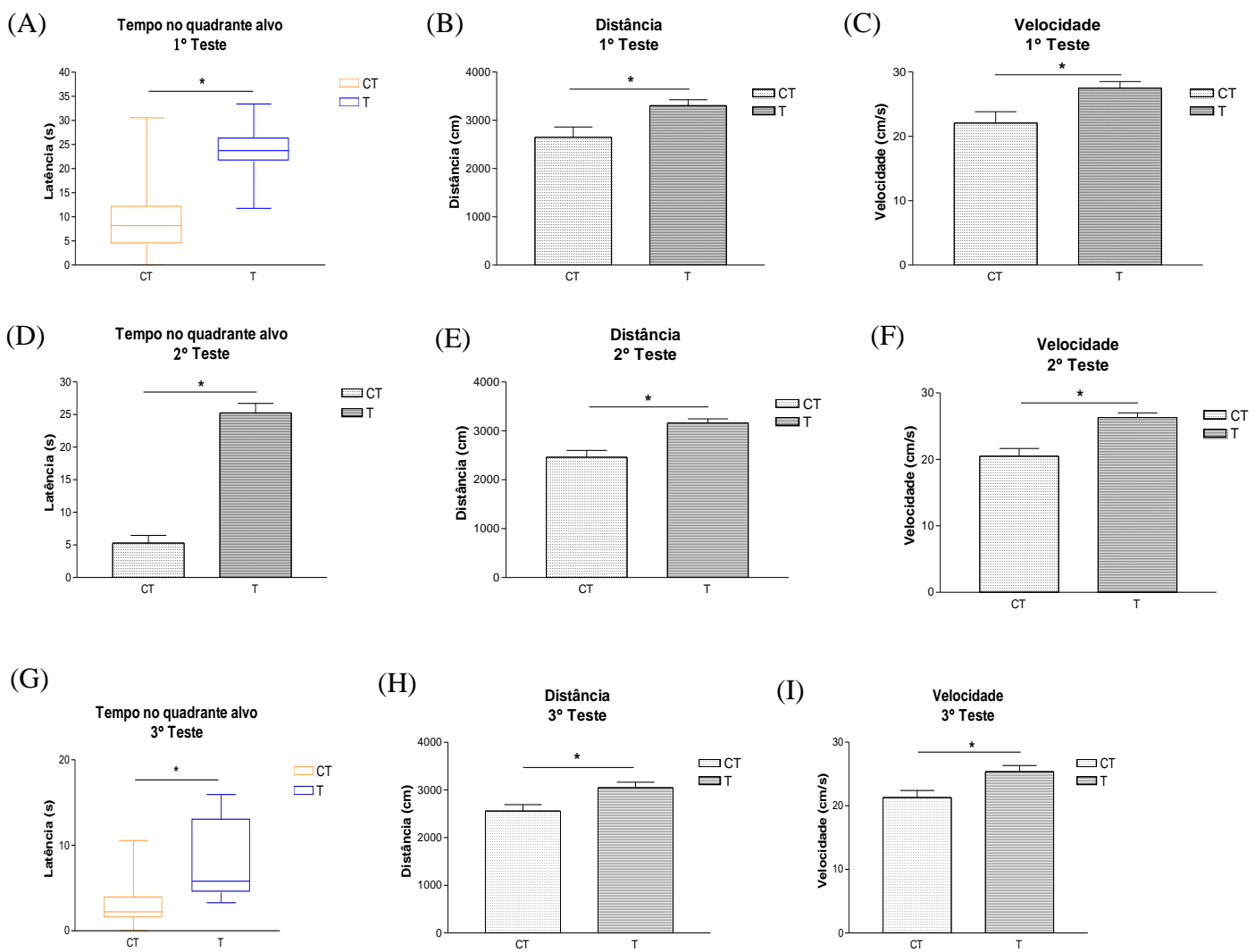


Figura 8 - Efeito do Treino em Experimento Controle dos fatores Exercício Físico/Estresse sobre o desempenho nos testes de memória no LAM. Parâmetros comportamentais medidos no 1° (5° dia de experimento), 2° (10° dia de experimento) e 3° (27° dia de experimento) testes de memória. Os gráficos em *box plot* mostram os valores máximo e mínimo obtidos, mediana e um quartil abaixo e um acima da mediana dos grupos CT (controle treino=sem atividade cognitiva) e T (treino=aprendizado espacial). Os gráficos de barra apresentam as médias dos grupos com erro padrão (SEM). Painéis A, B e C: 1° teste de memória; Painéis D, E e F: 2° teste de memória e; Painéis G, H e I: 3° testes de memória. Os dados são expressos em: (i) tempo (s) no quadrante alvo durante o 1° min (painéis A, D e G); (ii) distância (cm) percorrida (painéis B, E e H) e (iii) velocidade média (cm/s) (painéis C, F e I). Valores de significância estática e número de animais por grupo de cada gráfico são apresentados na tabela 3. * = $p < 0,05$

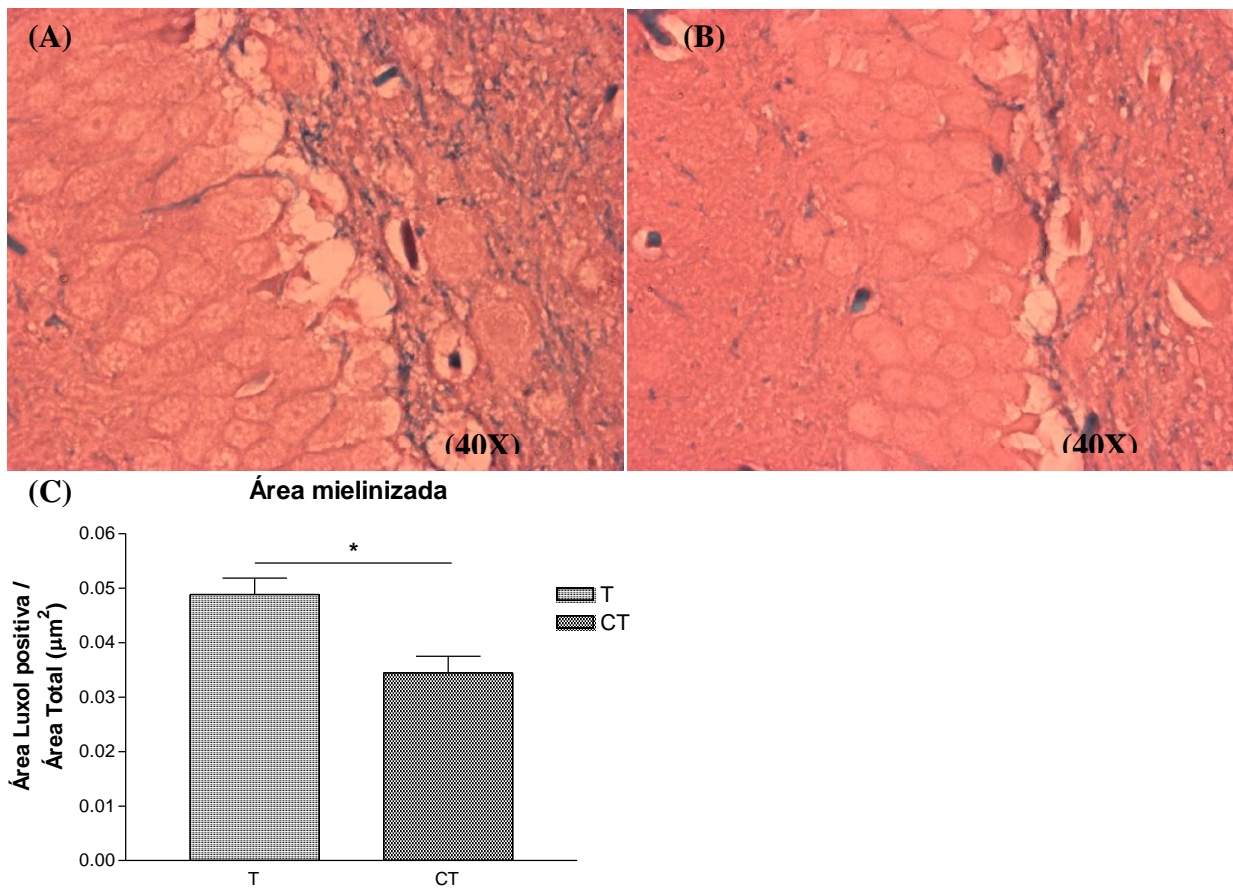


Figura 9 – Efeito do Treino no LAM: Experimento Controle dos fatores Exercício Físico/Estresse sobre a Área Mielinizada no Giro Denteado do Hipocampo. Os painéis A e B são imagens de histoquímica com *Lúxol Fast Blue* dos grupos T (Treino; n=24) e CT (Controle Treino; n=20), respectivamente. Dados apresentados no painel C dizem respeito ao valor da área marcada positivamente com *Luxol Fast Blue* (μm^2) dividida pela área total da imagem analisada (μm^2). O gráfico em barras apresenta valores de média e erro padrão. Foi observada diferença significativa na área mielinizada hipocampal dos animais dos 2 grupos analisados ($F = 6,365$; $p = 0,016$). * = $p < 0,05$

1.3 Análise da solução de oligômeros de BA

A solução do peptídeo BA foi analisada em MFA para comprovar a existência de oligômeros de BA (**figura 10**). As análises obtidas mostraram uma predominância de valores Z em aproximadamente 3 nm, com baixo desvio padrão. Esses resultados corroboram com a presença de oligômeros de BA na solução, uma vez que a forma oligomérica desse peptídeo apresenta valores Z entre 2 nm e 4 nm em análise por MFA (STINE *et al.* 1996; 2003).

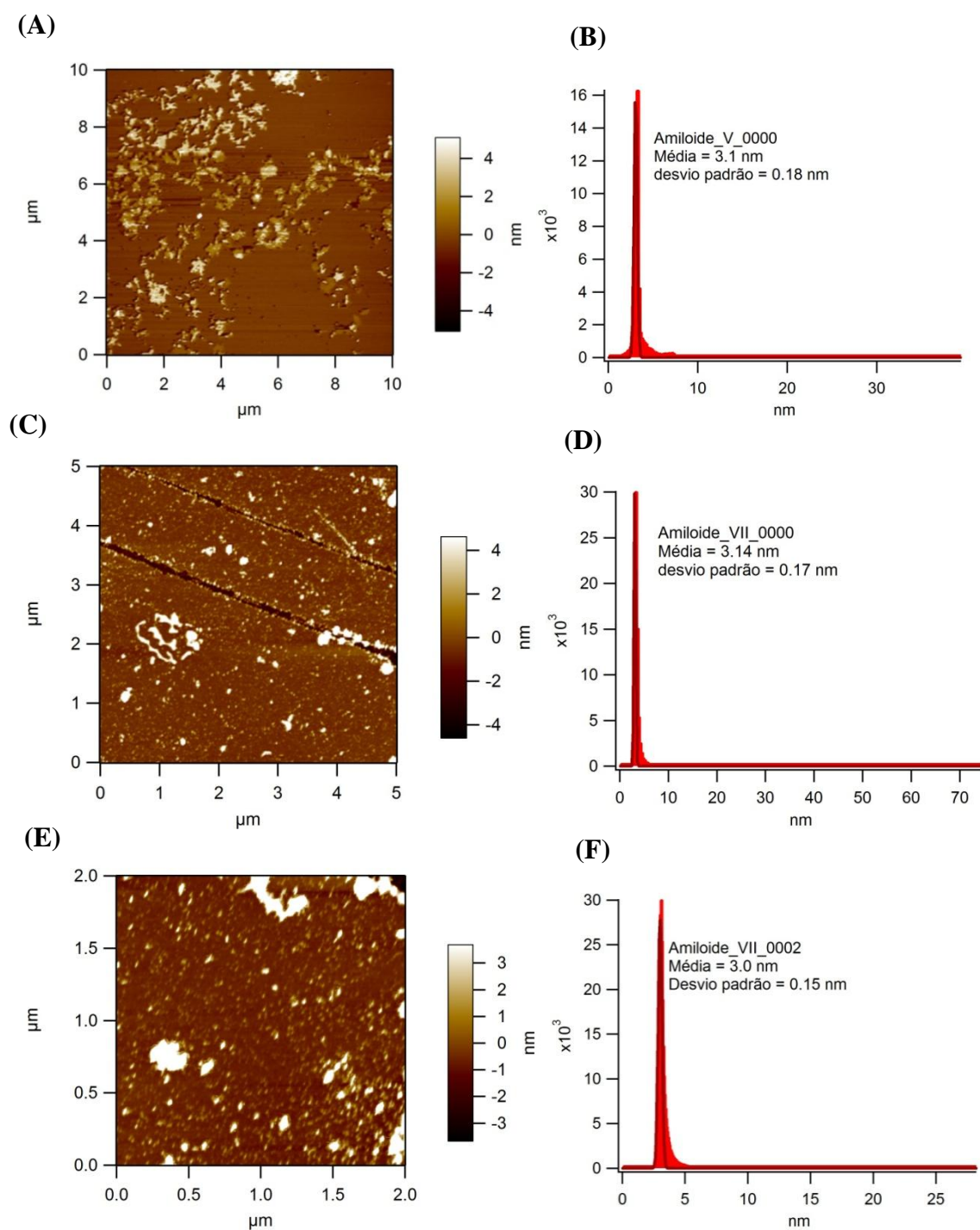


Figura 10 – **Dados da Análise de Microscopia de Força Atômica da solução de oligômeros de peptídeos BA.** Painéis A, C e E: imagens topográfica dos oligômeros de BA em solução nos campos de 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, 5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ e 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$, respectivamente. A barra lateral em cada imagem indica, por grau de coloração, qual o valor Z obtido em cada ponto da imagem. Os gráficos nos painéis B, D e F correspondem à curvas Gaussianas de frequência de distribuição da amostra de acordo com os valores Z obtidos nas análises A, C e E, respectivamente. As análises apresentaram médias variando entre 3.0 nm e 3.14 nm com desvio padrão variando entre 0,18 nm e 0,15 nm. Os resultados obtidos indicam uma presença dominante na solução de estruturas de tamanho correspondente a oligômeros de BA.

II. *Efeitos do treinamento cognitivo espacial no LAM, Injeção de oligômeros de BA e Relação entre os dois fatores*

II.1 *Parâmetros Comportamentais*

Aprendizado Espacial no LAM (Treinamento): As **figuras 11 e 12** mostram as curvas de aprendizado dos animais dos grupos T e TB, latência (s) e distância percorrida (cm), respectivamente. O teste fatorial (2 x 10) ANOVA com medidas repetidas no último elemento mostra um efeito significativo das sessões (latência – $F=30,640$ $p<0,001$; distância – $F=26,155$ $p<0,001$) não houve efeito significativo do grupo (latência – $F=0,255$ $p=0,618$; distância – $F=0,288$ $p=0,597$) nem interação significativa entre sessões e grupos (latência – $F=0,652$ $p=0,752$; distância – $F=0,581$ $p=0,812$). Esses resultados indicam que todos os animais aprenderam, igualmente, a tarefa no LAM. Cabe lembrar que durante esse treinamento os animais ainda não haviam sido estimulados com BA. Não foi encontrado efeito significativo dos grupos sobre a velocidade média dos animais durante o treino ($F=0,001$; $p=0,970$), havendo efeito das sessões ($F=5,079$; $p<0,001$) sem efeito de interação ($F=0,276$; $p=0,981$).

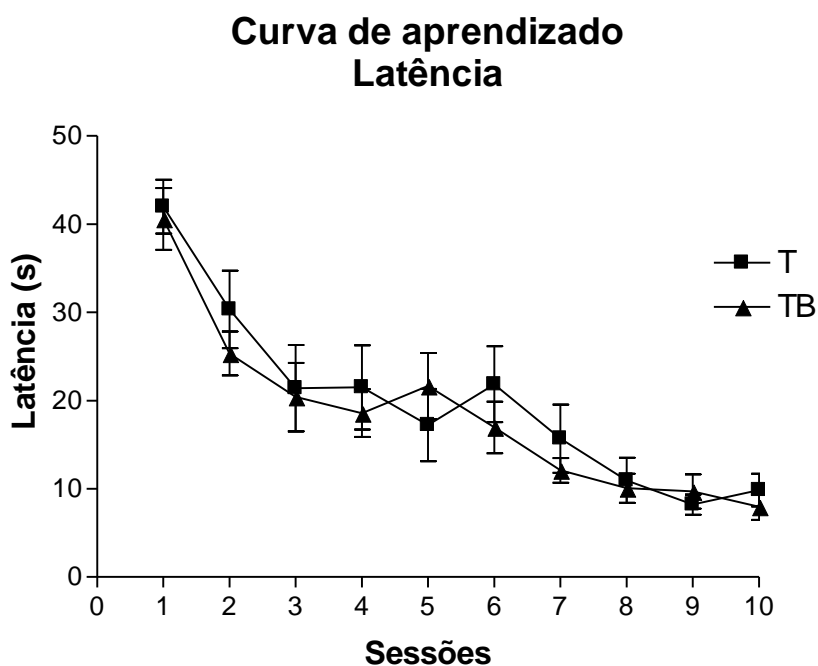


Figura 11 – **Curva de aprendizado espacial** dos animais dos grupos T (Treino; n=12) e TB (Treino Beta; n=12). Desempenho expresso em **latência (s)** para encontrar a plataforma. Eixo das abscissas: sessões/dias de treino. Os valores de latência foram obtidos pela mediana da média da latência dos animais de cada grupo durante as 4 tentativas de cada sessão. O teste fatorial ANOVA com medidas repetidas mostra um efeito significativo das sessões de treino ($F=30,640$; $p<0,001$) não havendo diferença entre os grupos ($F=0,255$; $p=0,618$) nem interação entre sessões e grupos ($F=0,652$ $p=0,752$).

Curva de aprendizado Distância

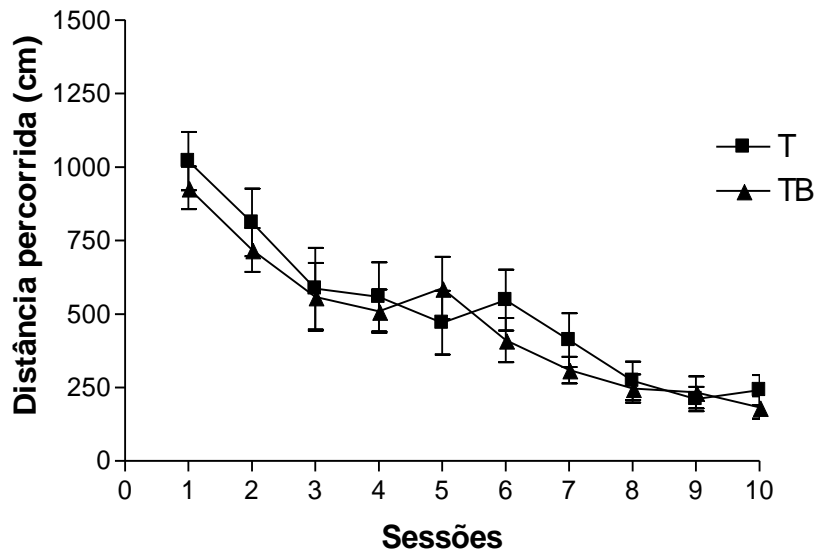


Figura 12 – **Curva de aprendizado dos animais dos grupos T (Treino; n=12) e TB (Treino Beta; n=12).** Desempenho expresso em distância percorrida (cm) para achar a plataforma. O eixo das abscissas mostra as sessões/dias de treino. Os valores de distância foram obtidos pela mediana da média da latência dos animais de cada grupo durante as 4 tentativas de cada sessão. O teste fatorial (2x10) ANOVA com medidas repetidas mostra um efeito significativo das sessões ($F=26,155$; $p<0,001$) não havendo efeito dos grupos ($F=0,288$; $p=0,597$) nem interação entre sessões e grupos ($F=0,581$; $p=0,812$).

1º, 2º e 3º Testes Comprobatórios (memória): Nesta etapa os animais dos grupos T e TB já haviam recebido injeções de veículo ou BA, respectivamente. ANOVA de uma via mostrou que não houve diferenças significativas no tempo despendido no quadrante alvo durante o primeiro minuto de teste, em nenhum dos testes de memória (1º teste - $F=0,752$ $p=0,395$; 2º teste - $F=0,012$ $p=0,914$; 3º teste - $F=1,657$ $p=0,214$). Os resultados indicam que o tratamento com BA não teve efeito na memória remota (ausência de amnésia retrógrada) da tarefa aprendida (**figura 13**). Contudo, após injeção de peptídeo BA os animais do grupo TB percorreram distâncias menores ($F=4,512$; $p=0,048$) e apresentaram menor velocidade média de nado ($F=4,506$; $p=0,048$), durante o 3º teste de memória (**figura 14**).

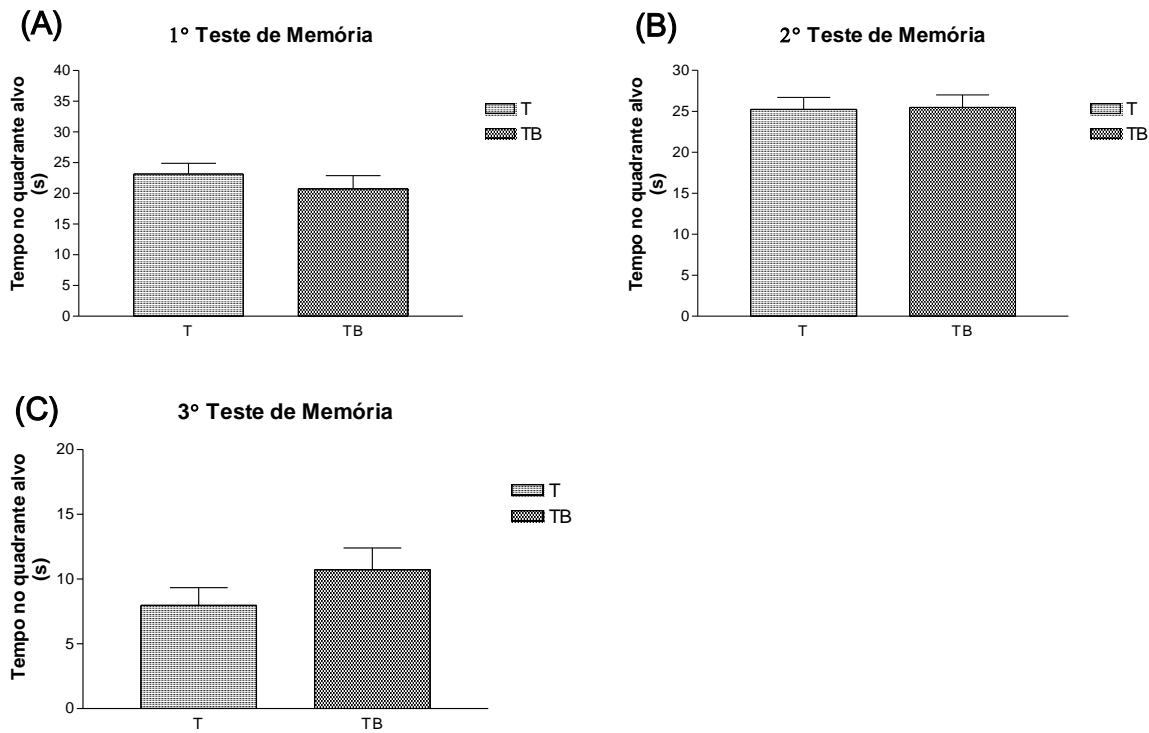


Figura 13 – **Dados (média \pm SEM) do desempenho dos animais no Teste Comprobatório: Memória espacial remota.** Painéis A, B e C: tempo (s) no quadrante alvo durante o primeiro min do primeiro, segundo e terceiro testes de memória, respectivamente. Grupos T (Treino) e TB (Treino Beta-Amilóide), no primeiro (T; n=12; TB; n=12), segundo (T; n=12; TB; n=12) e terceiro (T; n=11; TB; n=9) testes de memória. O teste ANOVA de uma via não mostra diferença significativa entre os grupos tanto no primeiro ($F=0,752$ $p=0,395$), quanto no segundo ($F=0,012$ $p=0,914$) ou terceiro ($F=1,657$ $p=0,214$) testes.

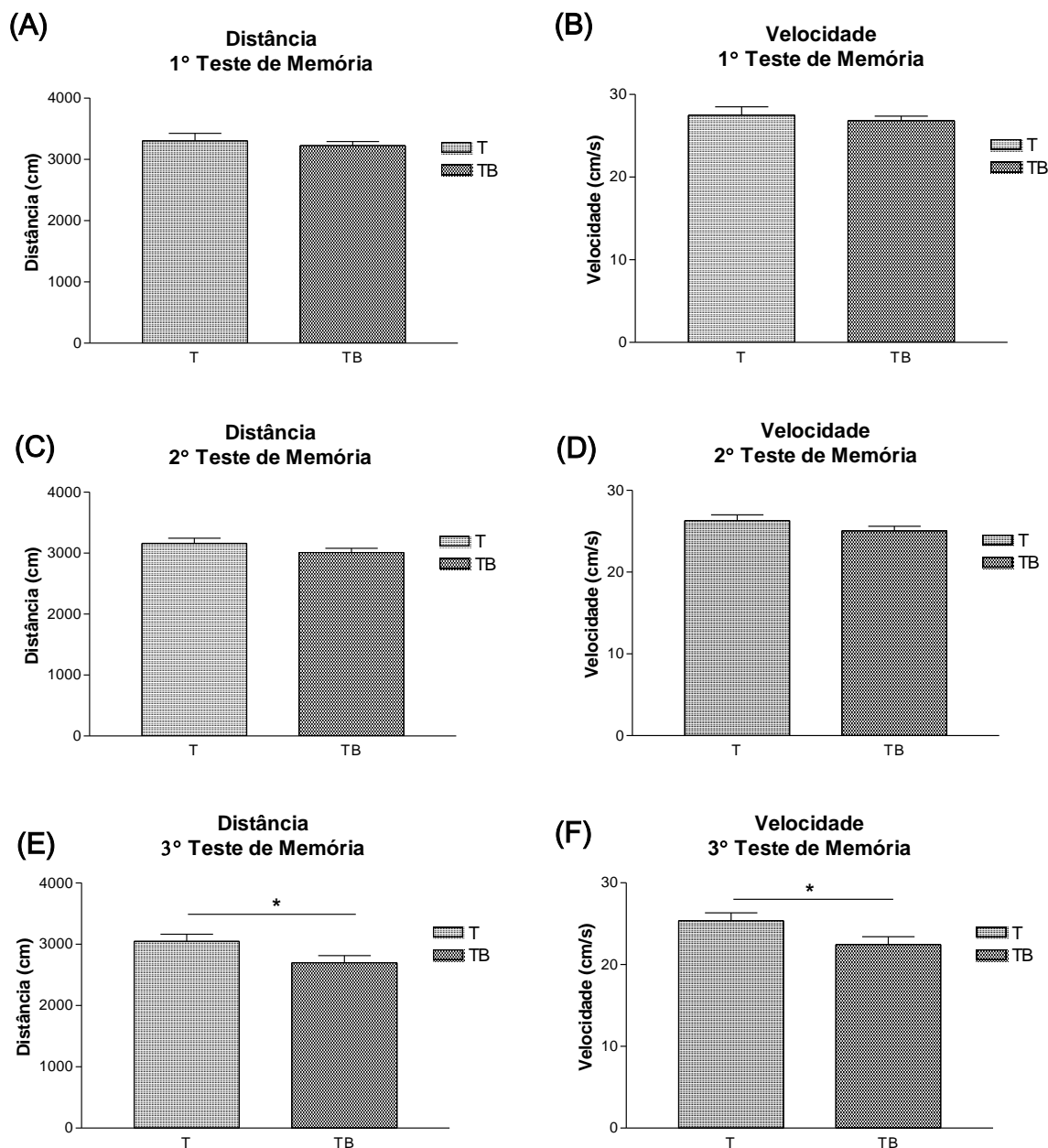


Figura 14 – **Desempenho (média \pm SEM) dos animais nos testes de memória.** Painéis A e B, C e D e E e F mostram os valores de distância percorrida (cm) e velocidade (cm/s) de nado no primeiro, segundo e terceiro testes de memória, respectivamente. São apresentados resultados dos grupos T (Treino) e TB (Treino Beta), no primeiro (T: n=12; TB: n=12), segundo (T: n=12; TB: n=12) e terceiro (T: n=11; TB: n=9) teste. O teste ANOVA de uma via não mostra diferença significativa dos valores de distância e velocidade no primeiro (distância: $F=0,310$ $p=0,583$; velocidade: $F=0,310$; $p=0,583$) e segundo (distância: $F=1,928$ $p=0,179$; velocidade: $F=1,929$ $p=0,179$) teste de memória. Contudo foi observado um decréscimo significativo na distância percorrida ($F=4,512$; $p=0,048$) e na velocidade de nado ($F=4,506$; $p=0,048$) dos animais TB no terceiro teste. * = $p < 0,05$

II.2 Parâmetros Neuroquímicos

Liberção de Glutamato de fatias do hipocampo: os resultados de liberaçõ de glutamato ($\mu\text{g/g}$ de tecido) em meio normal ou estimulado sã apresentados na **figura 15**. A análise por teste fatorial ANOVA ($2 \times 2 \times 2$), sendo os fatores: treino (com ou sem); BA (com e sem) e condiçõ do meio (normal e estimulado), mostra um efeito significativo da incubaçõ nos diferentes meios (normal e estimulado) ($F=4,958$; $p=0,029$). Contudo, nã foram observados efeitos do treinamento no LAM ($F=0,439$; $p=0,510$) ou da injeçõ de BA ($F=2,909$; $p=0,093$). Também nã foram observados efeitos de interaçõ entre os meios de incubaçõ com o treinamento ($F=1,687$; $p=0,198$), com a injeçõ de BA ($F=0,079$; $p=0,780$), ou interaçõ entre meio, treino e injeçõ de BA, considerados simultaneamente ($F=0,069$; $p=0,794$). Também nã foi observado efeito de interaçõ entre treinamento e injeçõ de BA ($F=0,316$; $p=0,576$). Esse tipo de análise nos indica que, com exceçõ do meio de incubaçõ, nã há efeito significativo de nenhum dos tratamentos (treino e/ou BA) sobre a liberaçõ de glutamato.

Contudo, se analisarmos a diferençã entre a liberaçõ em meio normal e a liberaçõ em meio estimulado de maneira independente para cada grupo, por meio de teste T e Mann-Whitney, podemos observar que todos os grupos apresentam diferençã significativa entre esses parâmetros (C – $Z=-2,100$ $p=0,038$; T – $t=-1,789$ $p=0,044$; TB – $t=-1,865$ $p=0,040$), com exceçõ do grupo B ($t=-0,226$ $p=0,411$). Tal análise indica a presençã de alteraçõ no sistema glutamérgico dos animais com injeçõ de BA. Alteraçõ essa que parece ter sido prevenida pelo treinamento prévio no LAM uma vez que o grupo TB apresenta diferençã significativa entre liberaçõ em meio normal e estimulado ($t=-1,865$ $p=0,040$).

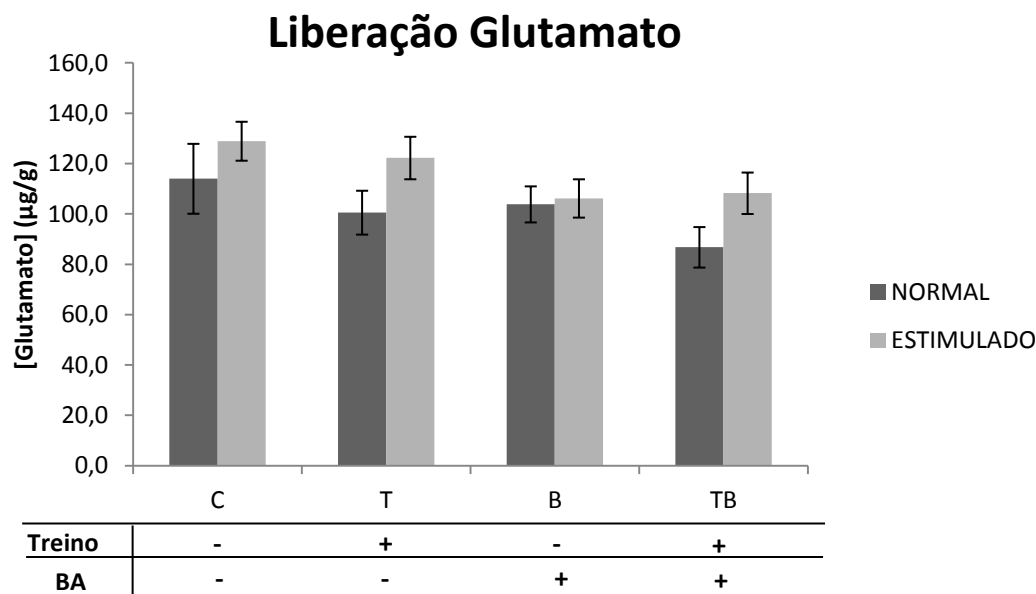


Figura 15 – Média \pm SEM da liberação de glutamato ($\mu\text{g/g}$) de tecido do hipocampo, em meio normal ou estimulado (KCl 30 mM). Grupos: C (Controle; n = 8), T (Treino; n = 11), B (Beta-amiloide; n = 9) e TB (Treino Beta-amiloide; n=9). ANOVA fatorial (2x2x2) (treino x BA x meio), mostra um efeito significativo da incubação nos diferentes meios ($F=4,958$; $p=0,029$). Não foram observados efeitos do treinamento no LAM ($F=0,439$; $p=0,510$), da injeção de BA ($F=2,909$; $p=0,093$), efeitos de interação entre os meios de incubação com o treinamento ($F=1,687$; $p=0,198$), com a injeção de BA ($F=0,079$; $p=0,780$), considerando ambos simultaneamente ($F=0,069$; $p=0,794$) ou mesmo interação entre treinamento e injeção de BA ($F=0,316$; $p=0,576$).

*Liberção de GABA de fatias do hipocampo: os resultados de liberação de GABA, em (ng/g de tecido)/100, em meio normal ou estimulado são apresentados na **figura 16**. A análise por teste fatorial ANOVA (2x2x2), mostra uma efeito significativo da incubação nos diferentes meios (normal e estimulado) ($F=82,647$; $p<0,001$). Não foram observados efeitos do treinamento no LAM ($F=0,074$; $p=0,787$) ou da injeção de BA ($F=0,490$; $p=0,486$). Também não foram observados efeitos de interação entre os meios de incubação com o treinamento ($F=0,222$; $p=0,639$), com a injeção de BA ($F=0,026$; $p=0,872$), considerando ambos simultaneamente ($F=2,787$; $p=0,100$) ou mesmo interação entre treinamento e injeção de BA ($F=2,751$; $p=0,102$). Os resultados indicam que após 8 dias de injeção de BA, com ou sem treinamento, não há diferença significativa na liberação de GABA.*

Liberação de GABA

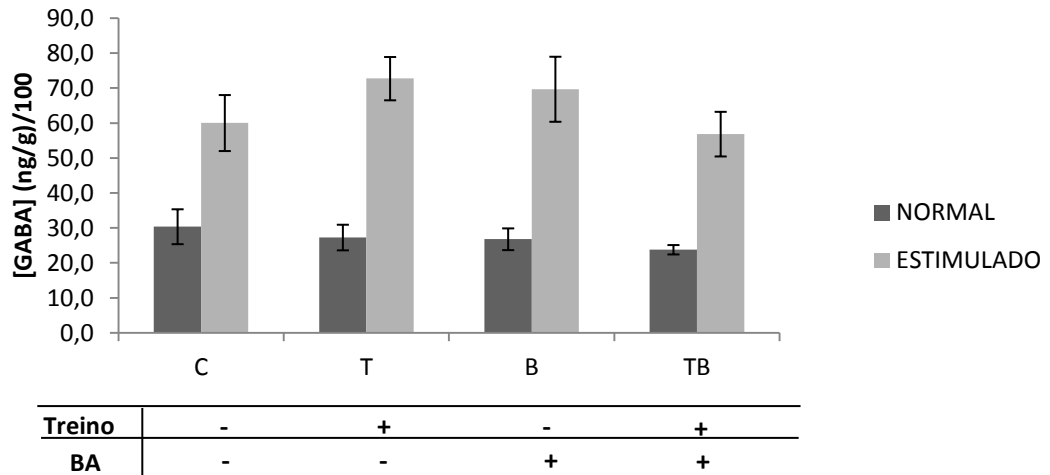


Figura 16 – Média \pm SEM da liberação de GABA, em (ng/g)/100, de tecido do hipocampo, em meio normal ou estimulado (KCl 30 mM). As barras apresentam os resultados de liberação, das amostras hipocâmpais dos animais dos grupos C (Controle; n = 8), T (Treino; n = 11), B (Beta; n = 9) e TB (Treino Beta; n=9). A análise por teste fatorial ANOVA (2x2x2) (treino x BA x meio), mostra efeito significativo da incubação nos diferentes meios ($F=82,647$; $p<0,001$). Não foram observados efeitos do treinamento no LAM ($F=0,074$; $p=0,787$), da injeção de BA ($F=0,490$; $p=0,486$), de interação entre os meios de incubação com o treinamento ($F=0,222$; $p=0,639$), com a injeção de BA ($F=0,026$; $p=0,872$), considerando ambos simultaneamente ($F=2,787$; $p=0,100$) ou mesmo interação entre treinamento e injeção de BA ($F=2,751$; $p=0,102$).

II.3 Determinações dos níveis de Citocinas no hipocampo

Foram dosadas as citocinas proinflatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e a citocina anti-inflatória IL10.

TNF- α : O teste ANOVA fatorial (2x2) não mostra efeito significativo do treinamento (F=0,555; p=0,462) ou da injeção de BA (F=1,425; p=0,242) nas concentrações de TNF- α . Contudo observamos um efeito significativo na interação entre esses dois fatores (F=5,794; p=0,022). Podemos observar pelo gráfico apresentado na **figura 17** que todos os grupos apresentaram aumento na concentração de TNF- α , comparados com o grupo C, contudo o aumento apresentado pelo grupo TB foi relativamente menor que o aumento apresentado pelos grupos T e B.

IL-1 β : A citocina IL-1 β apresentou um aumento significativo nos animais treinados na tarefa espacial do LAM, como indicado pelo efeito do treinamento observado através do teste ANOVA fatorial (2x2) (F=5,983; p=0,020). Não foi observado efeito da injeção de BA (F=0,012; p=0,914) ou interação desta com o treinamento (F=1,721; p=0,199) (**figura 18**).

IL-6: O teste de Kruskal-Wallis não apresentou diferença significativa entre os grupos com relação às concentrações de IL-6 hipocampais ($\chi^2 = 1,551$; p=0,671) (**figura 19**).

IL-10: Com relação à citocina IL-10, foi observado um efeito significativo da injeção de peptídeo BA (F=4,716; p=0,037), havendo um decréscimo na concentração dessa citocina nos grupos que sofreram esse tratamento (**figura 20**). Não foi encontrado efeito significativo do treinamento no LAM (F=0,007; p=0,932) ou interação entre treino e injeção de BA (F=0,230; p=0,634).

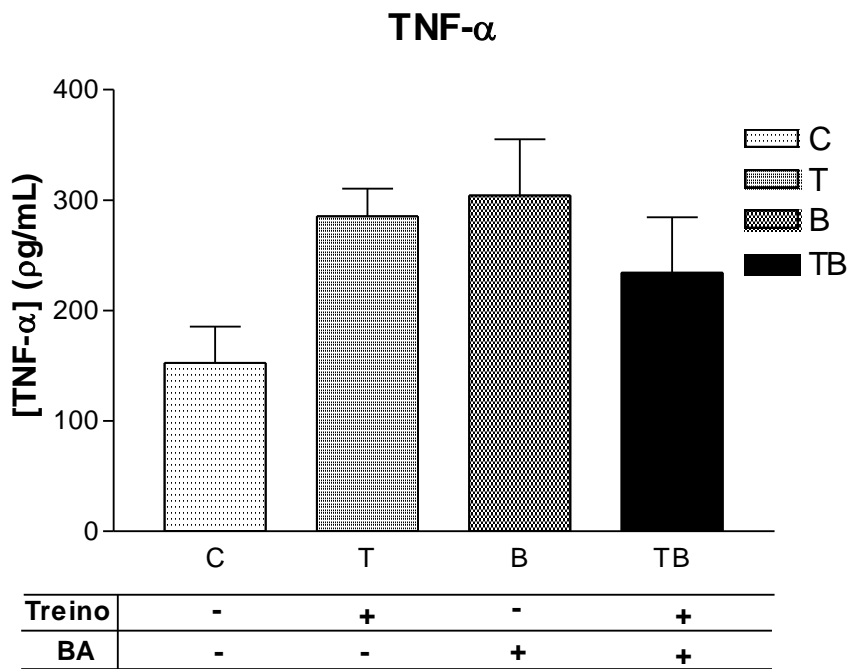


Figura 17 – **Resultados das concentrações de TNF- α (pg/mL)** no hipocampo dos grupos C (Controle; n=8), T (Treino; n=9), B (Beta; n=10) e TB (Treino Beta; n=8). A análise por ANOVA fatorial (2x2) não mostra efeito do treinamento (F=0,555; p=0,462) ou da injeção de BA (F=1,425; p=0,242) nas concentrações de TNF- α . Foi observado efeito significativo na interação entre esses dois fatores (F=5,794; p=0,022). (média \pm SEM)

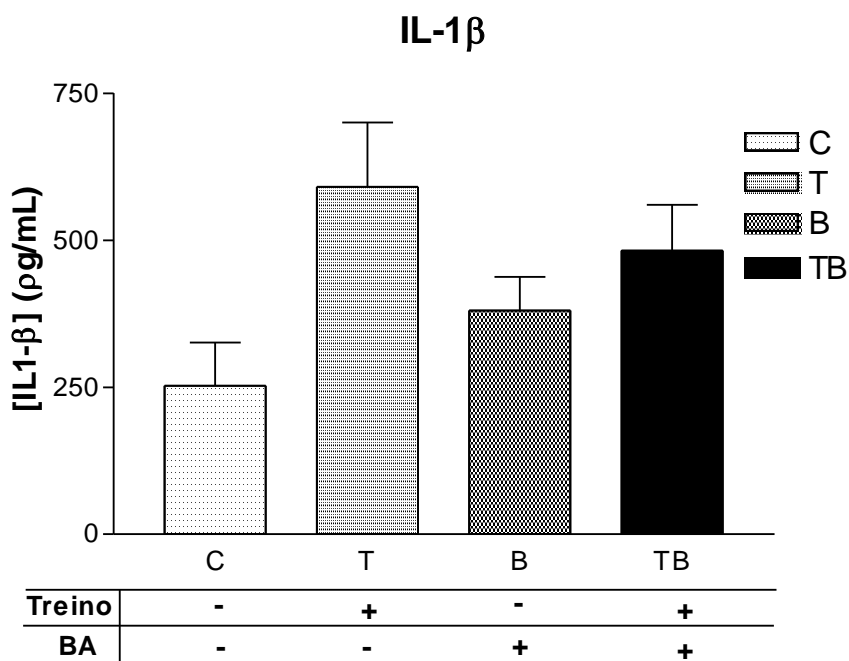


Figura 18 – **Resultados das concentrações de IL-1 β (pg/mL) no hipocampo** dos grupos C (Controle; n = 6), T (Treino; n = 11), B (Beta; n = 10) e TB (Treino Beta; n=9). ANOVA fatorial (2x2) mostra efeito significativo do treinamento (F=5,983; p=0,020). Não foi observado efeito da injeção de BA (F=0,012; p=0,914) ou interação entre injeção de BA e treinamento (F=1,721; p=0,199). (média \pm SEM)

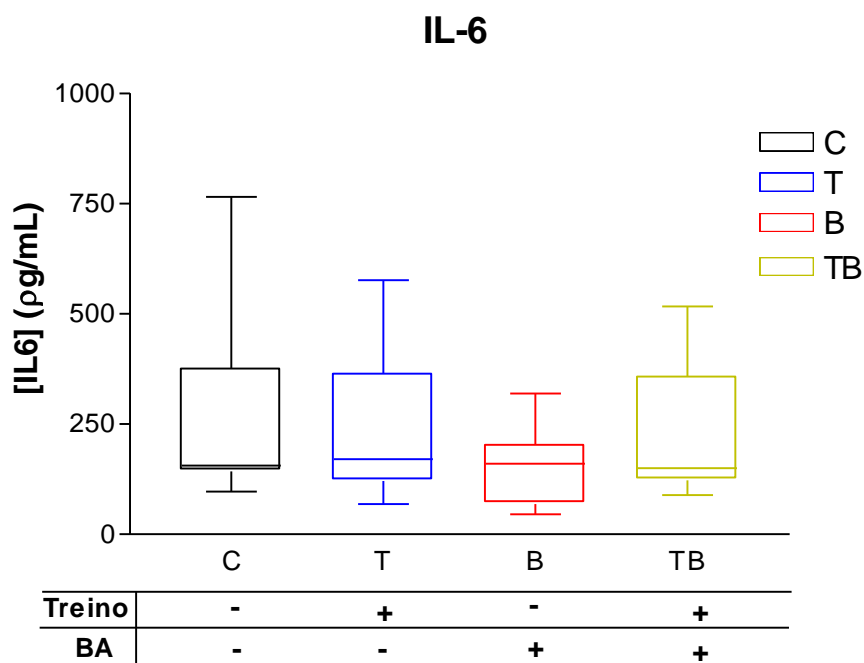


Figura 19 – **Resultados das concentrações de IL-6 (pg/mL) no hipocampo** dos grupos C (Controle; n = 8), T (Treino; n = 11), B (Beta; n = 9) e TB (Treino Beta; n=9). O gráfico em *box plot* mostra os valores máximo e mínimo, mediana e um quartil abaixo e um acima da mediana de cada grupo. A análise com teste Kruskal-Wallis indica a ausência de diferença significativa entre os grupos ($\chi^2 = 1,551$; $p = 0,671$).

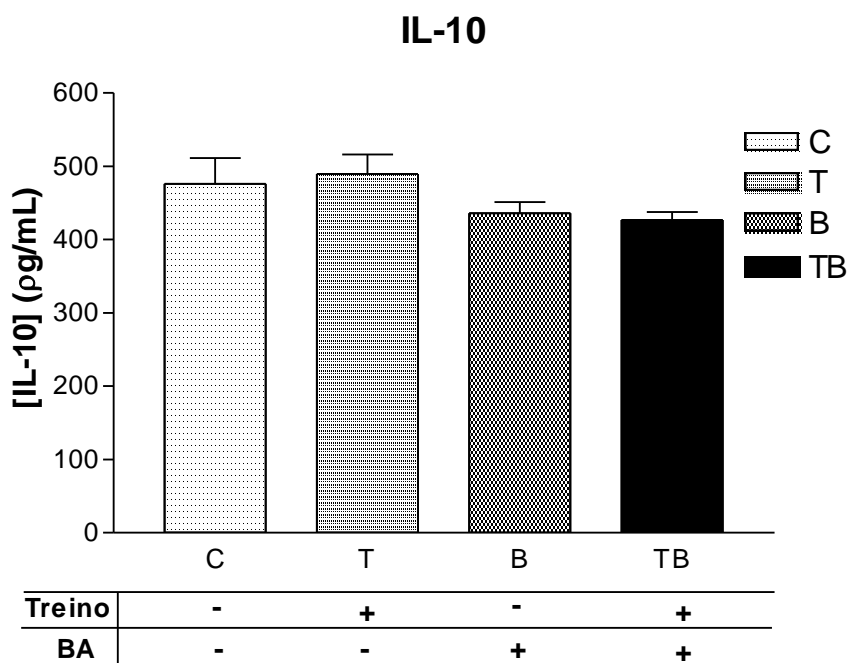


Figura 20 – **Resultados das de concentrações de IL-10 (pg/mL) no hipocampo** dos grupos C (Controle; n = 8), T (Treino; n = 11), B (Beta; n = 10) e TB (Treino Beta; n=9). ANOVA fatorial (2x2) mostra efeito significativo da injeção de BA ($F=4,716$; $p=0,037$). Não foi encontrado efeito significativo do treinamento no LAM ($F=0,007$; $p=0,932$) ou interação entre treino e injeção de BA ($F=0,230$; $p=0,634$). (média±SEM)

II.4 Parâmetros Morfológicos

Mielina no giro denteado do hipocampo: Como descrito previamente, os níveis de mielinização do hipocampo foram estudados por técnica morfométrica em lâminas coradas por *Luxol Fast Blue*. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa entre os grupos ($\chi^2 = 17,82$; $p < 0,001$) (**figura 21**). A análise *post hoc* com teste de Dunn indica que o grupo T apresenta significativamente mais mielina no giro denteado, comparado aos animais dos grupos C ($p < 0,01$), B ($p < 0,01$) e TB ($p < 0,01$). Os resultados indicam ainda que, a injeção de BA foi capaz de impedir a mielinização no hipocampo dos animais treinados, uma vez que o grupo TB não apresentou diferença significativa comparado com o grupo C ($p > 0,05$) ou B ($p > 0,05$). Cabe ressaltar que 8 dias de BA não foram capazes de gerar desmielinização em fibras do hipocampo, uma vez que o grupo B não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo C ($p > 0,05$).

Área de núcleos de células do giro denteado do hipocampo: Não foi encontrado efeito significativo dos tratamentos (treino e/ou BA) sobre a área de núcleo de células em lamina coradas por HE ($\chi^2 = 4,809$; $p = 0,186$) (**figura 22**).

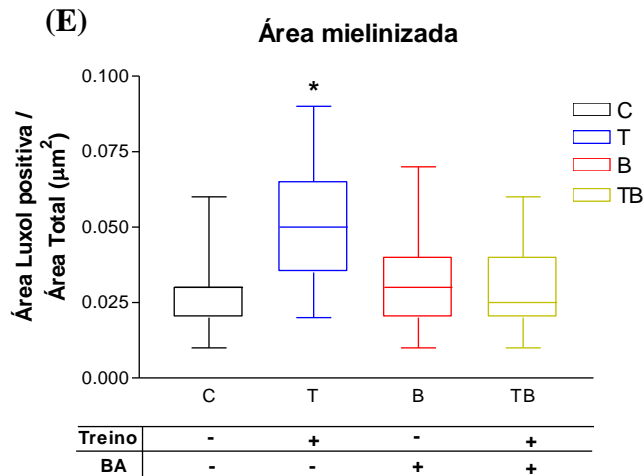
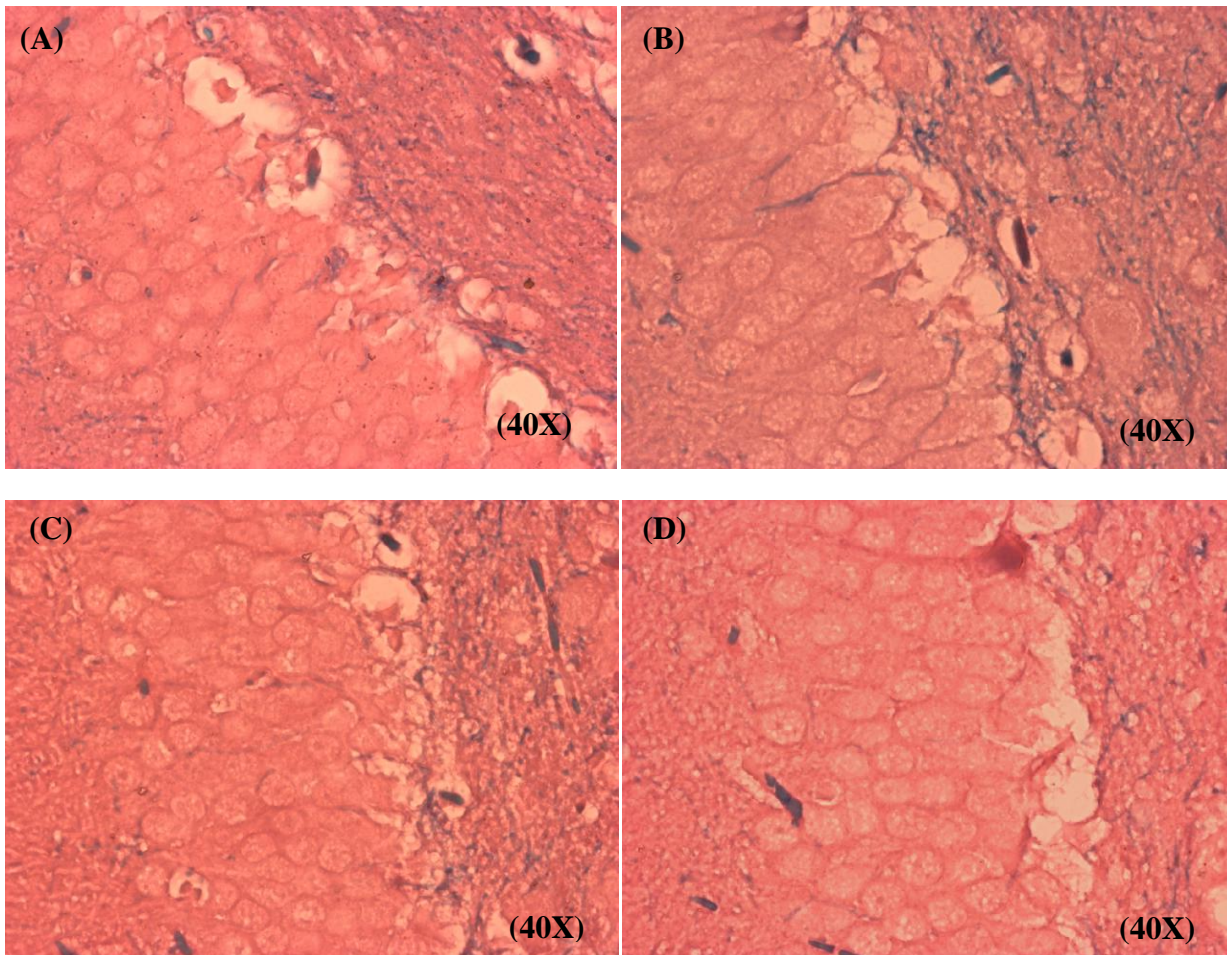


Figura 21 – **Dados das análises qualitativas e quantitativa de fibras de mielina no giro denteado (GD) do hipocampo.** Painéis A, B, C e D são imagens da histoquímica de cortes do hipocampo corados com *Lúxol Fast Blue* dos grupos C (Controle; n= 25), T (Treino; n=24), B (Beta; n=25) e TB (Treino Beta; n=20), respectivamente. Painel E: valor da área marcada positivamente com *Luxol Fast Blue* (μm^2) dividida pela área total da imagem analisada (μm^2). O gráfico em *box plot* mostra os valores máximo e mínimo, mediana e um quartil abaixo e um acima da mediana de cada grupo. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa entre os grupos ($\chi^2 = 17,82$; $p < 0,001$). A análise *post hoc* com teste de comparação múltipla de Dunn mostrou os seguintes resultados: T x C ($p < 0,01$); T x B ($p < 0,01$); T x TB ($p < 0,01$); TB x C ($p > 0,05$); TB x B ($p > 0,05$); B x C ($p > 0,05$). * = $p < 0,05$

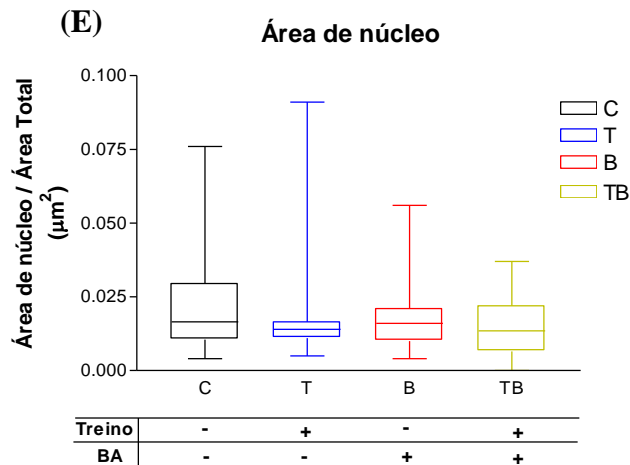
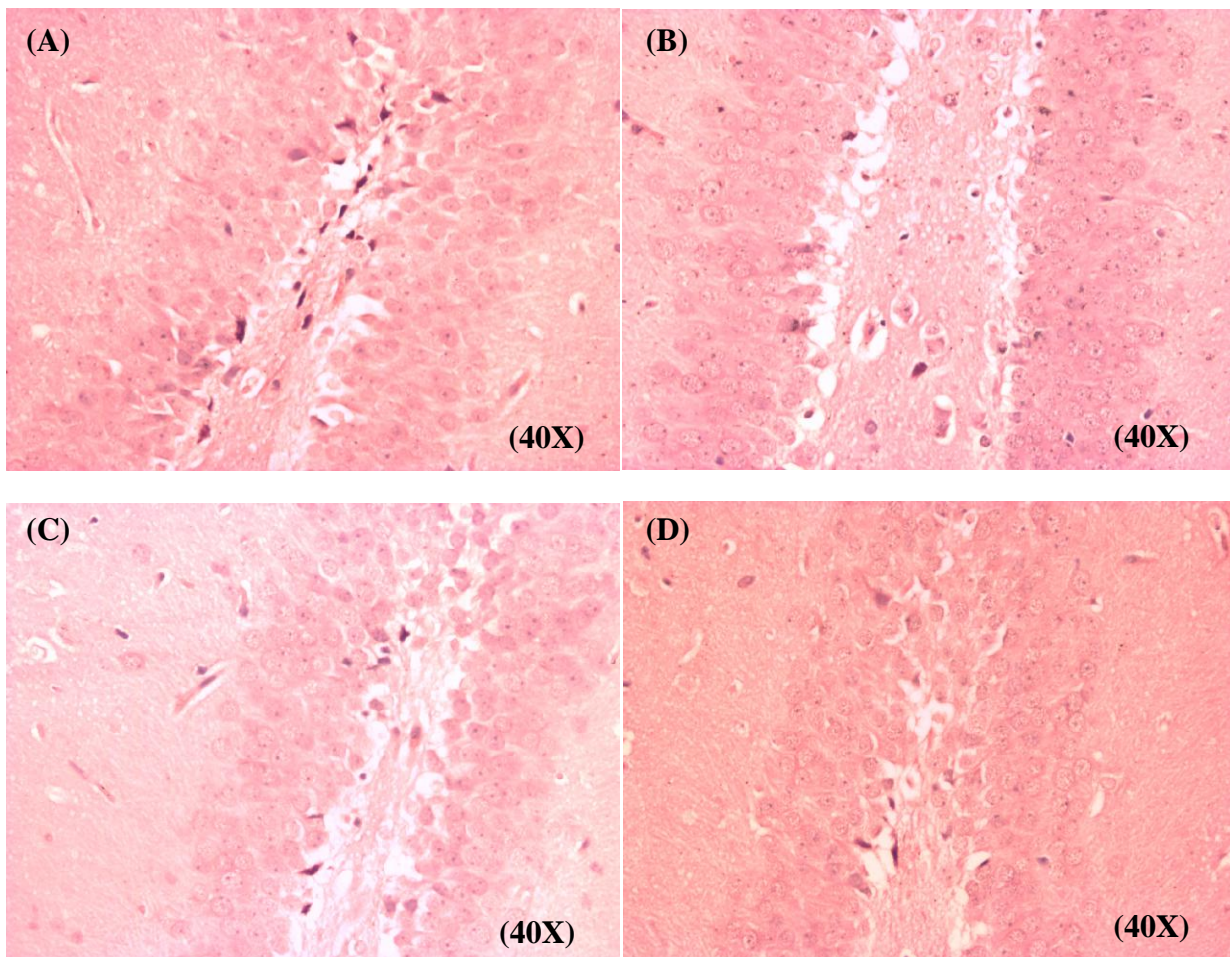


Figura 22 – **Dados das análises qualitativas e quantitativa dos núcleos de células do GD (giro denteado) do hipocampo.** Painéis A, B, C e D são imagens da histoquímica de cortes do hipocampo corados com *Lúxol Fast Blue* dos grupos C (Controle; n= 54), T (Treino; n=51), B (Beta; n=50) e TB (Treino Beta; n=34), respectivamente. Painel E: valor de área (μm^2) de núcleos, marcada positivamente com hematoxilina, dividida pela área total (μm^2) da imagem analisada. O gráfico em *box plot* mostra os valores máximo e mínimo, mediana e um quartil abaixo e um acima da mediana de cada grupo. O teste de Kruskal-Wallis indicou ausência de diferença significativa entre os grupos ($\chi^2=4,809$; $p=0,186$).

II.5 Regressão Linear Múltipla

Para análise de regressão linear inicialmente consideramos os valores de liberação de GABA e glutamato (meio normal, estimulado e estimulado/normal) como variáveis de interesse e as concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 como variáveis preditoras (**tabela 4**). Não foi encontrada relação entre as variações de liberação de GABA (normal- F=1,354 p=0,267; estimulado- F=1,637 p=0,183) e glutamato (normal- F=1,930 p=0,124; estimulado- F=0,455 p=0,768). Contudo foi observada relação significativa entre a variação da taxa entre GABA estimulado e normal ([GABA] meio estimulado / [GABA] meio normal) (F=5,985 p=0,001) e glutamato estimulado e normal ([glutamato] meio estimulado / [glutamato] meio normal) (F=3,524 p=0,015) com as concentrações das citocinas. O modelo resultante de tal regressão mostra um efeito significativo somente da citocina TNF- α na variação entre meio normal e estimulado, tanto para GABA (B=0,543 t=4,158 p<0,001) quanto para glutamato (B=0,456 t=3,218 p=0,003).

		Glutamato			GABA		
		Liberação em meio normal	Liberação em meio estimulado	Liberação em meio estimulado / liberação em meio normal	Liberação em meio normal	Liberação em meio estimulado	Liberação em meio estimulado / liberação em meio normal
CITOCINAS	TNF- α	t=-1,500; p=0,141; B=-0,226	t=0,820; p=0,417; B=0,132	t=3,218; p=0,003; B=0,456 *	t=-1,480; p=0,147; B=-0,228	t=1,829; p=0,075; B=0,279	t=4,158; p<0,001; B=0,543 *
	IL-1 β	t=-0,325; p=0,747; B=-0,050	t=0,547; p=0,587; B=0,089	t=0,155; p=0,877; B=0,022	t=1,375; p=0,177; B=0,215	t=1,157; p=0,254; B=0,179	t=0,226; p=0,822; B=0,030
	IL-6	t=1,031; p=0,309; B=0,154	t=0,358; p=0,722; B=0,057	t=-0,534; p=0,596; B=-0,075	t=0,377; p=0,708; B=0,057	t=-0,037; p=0,971; B=-0,006	t=-0,623; p=0,537; B=-0,080
	IL-10	t=-1,413; p=0,165; B=-0,211	t=-0,616; p=0,541; B=-0,098	t=-0,841; p=0,405; B=0,118	t=-1,035; p=0,307; B=-0,158	t=-0,094; p=0,926; B=-0,014	t=1,225; p=0,227; B=0,158

Tabela 4- Dados da Análise de regressão linear múltipla. As concentrações das citocinas, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram utilizadas como variáveis preditoras para as variações nas liberações de glutamato e GABA em meio normal, estimulado ou estimulado/normal. Foram utilizados na análise animais de todos os grupos num total de 46 animais. São apresentados na tabela os valores de “t”, “p” e “B”. * = p < 0,05

Em seguida as variáveis neuroquímicas GABA, normal e estimulado, e glutamato, normal e estimulado, foram consideradas como variáveis preditoras para os parâmetros morfológicos medidos (**tabela 5**). As taxas entre meios normal e estimulado de ambos os neurotransmissores não foram utilizadas nessa análise devido à alta taxa de correlação com as outras variáveis preditoras (liberação de GABA e glutamato em meio normal ou estimulado). Foi observada uma relação significativa entre as variações de área mielinizada dos animais e as variáveis neuroquímicas ($F=3,041$ $p=0,044$). Os valores de liberação de glutamato ($B=-0,667$ $t=-2,427$ $p=0,026$) e GABA ($B=0,684$ $t=2,745$ $p=0,013$) em meio estimulado, apresentaram relevância significativa no modelo proposto para explicar os níveis de mielinização do hipocampo. Foi, ainda, observada uma relação significativa entre as variáveis preditoras neuroquímicas e a área de núcleo marcada em HE ($F=4,140$ $p=0,015$). Contudo o modelo não foi capaz de encontrar valor significativo em nenhuma das variáveis preditoras de maneira independente.

Não foi observada relação linear entre nenhum dos parâmetros comportamentais quantificados e os dados neuroquímicos, inflamatórios ou morfológicos dosados (dados não apresentados).

		Área de núcleo de células no Giro Denteado	Área mielinizada no Giro Denteado
GLUTAMATO	Liberação em meio normal	t=1,762; p=0,095; B=0,393	t=-0,452; p=0,657; B=-0,108
	Liberação em meio estimulado	t=1,062; p=0,302; B=0,273	t=-2,427; p=0,026; B=-0,667 *
GABA	Liberação em meio normal	t=1,566; p=0,135; B=0,331	t=-0,789; p=0,440; B=-0,178
	Liberação em meio estimulado	t=-0,437; p=0,668; B=-0,102	t=2,745; p=0,013; B=0,684 *

Tabela 5- Dados da Análise de regressão linear múltipla. A liberação de glutamato e GABA, em meio normal ou estimulado, foi utilizada como variáveis preditoras para as variações na Área de núcleo celulares e área mielinizada do Giro Denteado (GD). Foram utilizados na análise animais de todos os grupos num total de 46 animais. São apresentados na tabela os valores de “t”, “p” e “B”. * = $p < 0,05$

Discussão e Conclusão

Efeitos da cirurgia de estereotaxia

A análise dos efeitos da cirurgia de estereotaxia mostrou um aumento na área de núcleo dos animais operados ($Z=-2,172$; $p=0,03$). Tal resultado indica um possível aumento no número de células e/ou mudança na expressão genética das células, relacionada, por exemplo, com uma hiperatividade celular. Evidentemente, só podemos levantar hipóteses sobre esse efeito de aumento de marcação por hematoxilina, baseando-se em fenômenos relacionados à cirurgia. Podemos, por exemplo, supor um evento de astrogliose ou microgliose como resposta a introdução da cânula no SNC dos animais. Em eventos de astrogliose e/ou microgliose, comum em diversas doenças, é observado o aumento de células astrocíticas e microgliais, respectivamente. Tais células também alteram sua expressão gênica e passam a produzir diversas citocinas, como o TNF e IL-1 β (Ryu & McLarnon, 2008; Maccioni, Muñoz, & Barbeito, 2001; Członkowska & Kurkowska-Jastrzębska, 2011). Contudo a ausência de alterações nas citocinas pro ou anti-inflamatórias, detectada no momento do sacrifício, corrobora com uma ausência de resposta inflamatória devido à cirurgia. Esse fato nos leva a levantar a hipótese de que a determinação da área de núcleo de células do GD do hipocampo, em HE, pode estar ilustrando um processo de resposta imunológica à introdução da cânula que ocorreu logo após a cirurgia e, considerando que os dois fenômenos devem ter cinéticas diferentes, a reestabilização da produção de citocinas ocorreu primeiro, enquanto o tamanho do núcleo não retornou ao normal até o momento do sacrifício. Baseado nessa hipótese e na ausência de alterações em todos os outros parâmetros medidos, o efeito da cirurgia de estereotaxia foi considerado irrelevante como fator de interferência nos efeitos dos tratamentos avaliados no presente estudo. Cabe também lembrarmos que todos os animais, com exceção dos animais do grupo CC, foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico. Por isso os efeitos dos tratamentos (treino e/ou BA) avaliados nos animais dos grupos C, T, CT, B e TB não estão relacionados com

efeitos da cirurgia de estereotaxia.

Efeito do treinamento com ou sem esforço cognitivo

Não foi objetivo principal desse trabalho avaliar os efeitos do exercício físico sobre as variáveis comportamentais e biológicas. No entanto, com o propósito de enriquecer a discussão sobre os efeitos de componentes do treino na tarefa executada no LAM, considerando as diferenças entre o esforço cognitivo e os efeitos da natação/ estresse envolvidos no treinamento, decidimos incluir um experimento controle, avaliando os efeitos do treino cognitivo, comparando os grupos T (treino cognitivo+exercício físico/estresse) e CT(exercício físico/estresse). Os resultados de tempo no quadrante alvo, durante os 3 testes de memória, mostram que os animais do grupos T lembraram do local da plataforma, enquanto os animais do grupo CT nadaram aleatoriamente pela piscina, durante a execução dos três testes. Mais do que isso, podemos observar que os animais do grupo CT percorreram menores distâncias e nadaram em velocidades menores durante os 3 testes de memória. Essa diferença de motricidade (distância percorrida e velocidade média) pode ser devido ao fator motivacional. Nos testes de memória os animais do grupo T procuravam a plataforma no local aonde ela deveria estar – quadrante alvo - de acordo com o que aprenderam durante as sessões de treino. Já os animais CT não tinham nenhuma razão para procurar algo no quadrante alvo. A motivação para encontrar a plataforma pode ter sido a razão da diferença de motricidade entre os grupos T e CT. Outra possibilidade a ser considerada seria uma atribuição diferente do valor do estímulo aversivo, dada pelos animais do grupo CT, que não passaram pela experiência do reforço positivo (plataforma), quando comparados aos animais do grupo T, que tiveram essa experiência. Não se pode descartar a possibilidade do efeito do treino sobre um maior tempo no quadrante alvo (memória), apresentado pelos animais do grupo T, tenha sido devido ao fato desses animais estarem nadando mais rápido, percorrendo uma distancia maior e, portanto, conseqüentemente com maior probabilidade de passar mais tempo no quadrante alvo. No entanto, se isto fosse o caso, os animais

do grupo T iriam passar mais tempo também nos outros três quadrantes. Isto não aconteceu, ou seja, os animais do grupo T apresentaram uma preferência pelo quadrante alvo, quando comparados com os animais do grupo CT, que permaneceram aleatoriamente, em tempos similares nos quatro quadrantes.

A existência do treinamento cognitivo espacial na tarefa executada pelos animais do grupo T foi capaz de aumentar a área mielinizada do hipocampo, de maneira significativa, quando comparada a área mielinizada no hipocampo dos animais que não tiveram esse componente na tarefa do LAM ($F=6,365$; $p=0,016$). Ou seja, o processo de aprendizagem envolve alteração na estrutura do hipocampo. Vale destacar que o hipocampo é uma região que tem papel importante em processos cognitivos espaciais (PIRES, PEREIRA, *et al.*, 2001; JIANG, YU, *et al.*, 2012). Esse dado corrobora com a hipótese de que a mielina é constantemente remodelada pelos processos de aprendizagem e memória (FIELDS, 2010). Mais do que isso esses dados indicam a ocorrência de um mecanismo de reserva cognitiva passiva, ou reserva cerebral, como definido por STERN (2009), nos animais cujo treinamento exigiu um esforço cognitivo. Essa reserva passiva, observada pelo aumento da área mielinizada, indica um aumento da rede neural que poderia permitir que a mesma suportasse insultos por mais tempo, retardando o aparecimento de sintomas clínicos.

Efeitos do treinamento cognitivo espacial no LAM, Injeção de oligômeros de BA e Relação entre os dois fatores

Os resultados das sessões de treinamento mostram que os animais dos dois grupos aprenderam a tarefa igualmente e, portanto, não houve diferença na linha de base em relação ao desempenho cognitivo. Apesar da ocorrência de alterações biológicas, detalhadas abaixo, os animais não apresentaram alterações na memória da tarefa após a injeção de peptídeo BA. Portanto, esses resultados indicam que as alterações neuroquímicas, inflamatórias e morfológicas observadas no presente estudo, ocorrem sem afetar o desempenho em tarefa cognitiva espacial. A partir desses

achados, poderia se pensar que, provavelmente, as disfunções nesses parâmetros biológicos observados nos pacientes com DA ocorrem em estágios iniciais da patologia, antes do aparecimento de sintomas clínicos de disfunções cognitivas. Nesse sentido a escolha da formulação oligomérica do peptídeo BA torna-se condizente com essa hipótese, pois, os oligômeros se tratam de um estágio inicial da dinâmica de aglomeração do peptídeo BA (STINE *et al.* 1996; STINE *et al.* 2003).

Com relação á injeção de peptídeo BA devemos supor, pela dinâmica de difusão do peptídeo solúvel observada por Waters (2010), que ao longo de 8 dias o peptídeo tenha se difundido para outras regiões, como por exemplo o neocórtex. Devemos considerar também que os animais utilizados nesse experimento possuíam grande capacidade de *clearance* desse peptídeo devido á idade pouco avançada desses (2-3 meses) (Waters, 2010). A escolha de se trabalhar com animais mais novos se deve as evidências de maiores efeitos do treinamento cognitivo nesses animais (Lindner & Schallert, 1988).

Apesar da ausência de alterações na memória da tarefa aprendida, a injeção de BA ocasionou um decréscimo na velocidade de nado ($F=4,506$; $p=0,048$) e distância percorrida ($F=4,512$; $p=0,048$) pelos animais. Esse tipo de decréscimo na atividade motora se assemelha a adaptação comportamental devido a um estado patológico do animal conhecida como *Sickness Behavior*. Animais que apresentam esse tipo de comportamento tendem a diminuir comportamentos de exploração, contato social e ingestão de comida. Tal comportamento já foi associado a prejuízos na produção de IL-10 (Moon, McNeil, & Freund, 2011; Miller, 1964) como os apresentados pelos animais, que receberam injeção de BA, no presente estudo. Uma outra possibilidade seria um efeito do BA em circuitos centrais associados à função motora, devido à difusão dos oligômeros, como mencionada acima, para centros motores.

A análise estatística fatorial dos dados neuroquímicos mostrou um efeito significativo do meio de incubação sobre os níveis de liberação de glutamato. Esse efeito pode ser observado na figura 15, na qual se verifica um efeito do meio despolarizante sobre a liberação de glutamato e uma ausência desse efeito nos animais do grupo B (que receberam BA). Apesar da análise fatorial não

indicar efeito dos tratamentos, os dados apresentados na figura 15 indicam um provável efeito da injeção de BA ($p=0,09$). Uma réplica (aumento do tamanho da amostra) em estudo futuro pode confirmar esse achado. Baseado nessas observações decidimos, mesmo cientes da incidência dos erros tipo I e II, a título de explorar melhor esses resultados aplicar uma análise estatística para cada grupo (tratamento) individualmente. Os resultados obtidos dessa análise mostrou um efeito do peptídeo BA no aumento da liberação de glutamato induzido pela estimulação com KCl (30 mM). Esse resultado, ausência de diferença entre o glutamato liberado em meio normal e estimulado, ocasionada pela injeção de BA está de acordo com outros autores que observaram uma hipofunção do sistema glutamérgico, devido a presença desse peptídeo (PALOP e MUCKE, 2010; LI, JIN, *et al.*, 2011; RAMMES, HASENJÄGER, *et al.*, 2011). Com base nos dados da literatura e desse experimento podemos conceber que, frente ao acúmulo de BA o SNC tende a responder inicialmente com um aumento de glutamato na fenda sináptica e posteriormente com a ativação exacerbada de mecanismos de *downregulation* gerando uma hipofunção do sistema glutamérgico que duraria até 8 dias pós injeção de BA. Dados de estimulação *in vitro* com oligômeros de BA, em neurônios hipocámpais, por apenas algumas horas mostram o aumento da concentração glutamérgica na fenda sináptica (BRITO-MOREIRA e PAULA-LIMA, *et al.*, 2011). Esse aumento inicial de glutamato pode ser explicado por facilitação da liberação deste, por ativação de mecanismos de retroalimentação (PALOP e MUCKE, 2010). O aumento de glutamato combinado com a presença de altas concentrações de BA ocasionaria então diversas respostas de inibição desse sistema de neurotransmissão. Como por exemplo, uma diminuição na ativação dos neurônios pós-sinápticos devido à ativação de receptores no espaço extra sináptico desse, ativando vias de *down regulation*, o que resultaria na internalização e dessensibilização de receptores NMDA e AMPA (PALOP e MUCKE, 2010; LI, JIN, *et al.*, 2011; RAMMES, HASENJÄGER, *et al.*, 2011; LI, HONG, *et al.*, 2009). Devemos considerar também o efeito desse peptídeo no aporte de substrato para a produção de glutamato nos neurônios. Os dados da literatura mostram alterações na função dos astrócitos devido a presença do peptídeo BA. Alterações essas que poderiam prejudicar a

dinâmica de síntese do glutamato (OLABARRIA, NORISTANI, *et al.*, 2011; RODRIGUEZ-KERN, GEGELASHVILI, *et al.*, 2003). Como resultado é observado a ocorrência de LTD que poderia ter relação direta com a perda de sinapses e os déficits de memória observados na DA (PALOP e MUCKE, 2010). As evidências citadas acima poderiam explicar as alterações glutamatérgicas observadas no presente estudo. Cabe considerar que o modelo utilizado estuda estados iniciais do acúmulo de Beta Amiloide e, considerando a plasticidade do SNC, e de se esperar que o resultado final em paciente mais avançados com DA não seja a hipoatividade do sistema glutamatérgico. Acreditamos que se trate de um processo cíclico no qual ocorra uma alternância entre hiper e hipo atividade desse sistema de neurotransmissão. De qualquer maneira podemos afirmar com certo grau de confiança que independente do estágio da doença o sistema glutamatérgico teria sua função prejudicada.

É interessante notar que os animais com injeção de BA, porém treinados no LAM, apresentaram diferença significativa entre liberação de glutamato em meio normal ou despolarizado ($t=-1,865$ $p=0,040$). O que indica que a excitabilidade do sistema glutamatérgico desses animais foi mantida. Contudo não observamos efeitos significativos do treino ou interação deste com injeção de BA nas concentrações de glutamato em meio normal ou estimulado. Os resultados nos levam a crer que a excitabilidade do sistema glutamatérgico poderia estar sendo mantida pelo treino devido a alterações geradas em outro sistema de neurotransmissão. A análise ANOVA fatorial (2x2), com fatores treino e injeção de BA, mostrou uma tendência a efeito de interação entre o treinamento e a injeção de BA na liberação de GABA somente em meio estimulado ($F=3,249$; $p=0,081$). Considerando esse resultado podemos deduzir que o treino associado ao tratamento com BA parece atuar diminuindo a liberação de GABA – esta tendência pode ser observada na figura 16 - em condições de estimulação, restabelecendo assim a sensibilidade do sistema glutamatérgico em termos de resposta ao estímulo despolarizante. Sabe-se que os interneuronios GABAérgicos regulam a excitabilidade das redes neuronais hipocámpais (Antonucci, *et al.*, 2012). Já foi mostrado que intervenções no sistema GABAérgico são capazes de aumentar a função cognitiva (Johnstone, *et al.*, 2011; Watabe,

Yamaguchi, & Ashida, 1993) e diminuir o efeito deletério de situações patológicas (Ricci, Valoti, Sgaragli, & Frosini, 2011; Mao, et al., 2012). Dados da literatura mostram também que diferentes modelos de treinamento alteram o sistema GABAérgico (Saar, Reuveni, & Barkai, 2012; Guo, Zhang, Zhu, Cai, Zhou, & Sun, 2012). Nossos resultados sugerem que o treinamento cognitivo espacial pode interferir na atividade GABAérgica, compensando efeitos deletérios dos oligômeros de BA. Tal proteção devido ao treinamento no LAM poderia ser interpretada como um mecanismo de reserva cognitiva ativa, definida por Stern (2009) como compensação neural.

Com relação às concentrações de citocinas os resultados nos mostra uma diminuição da produção de IL-10 nos animais que receberam injeções de BA com ou sem treinamento. Tal alteração esta de acordo com a diminuição de monócitos capazes de produzir IL-10 observada em pacientes com DA (SARESELLA, CALABRESE, *et al.*, 2011). Considerando as funções da citocina IL-10 descritas por JANEWAY, TRAVERS, *et al.* (2001) podemos concluir que a diminuição dessa citocina, observada nos animais com BA, poderia favorecer o aparecimento de um quadro inflamatório, reforçando assim a relevância dos aspectos inflamatórios na DA. O modelo de treino intensivo usado no presente estudo - tarefa cognitiva espacial no LAM – não foi capaz de interferir no efeito induzido pelos oligômeros de BA sobre os níveis de IL-10.

Com respeito aos efeitos do peptídeo BA na produção de citocinas relacionadas à inflamação foi observado ainda um efeito significativo do treinamento nas alterações geradas, pela injeção desse peptídeo, na produção de TNF- α ($F=5,794$; $p=0,022$). Pela observação da **figura 17** encontramos um aumento de TNF- α devido à injeção de BA que foi inibido pela presença do treinamento. Ou seja, o efeito do BA é diferente se o animal foi ou não treinado, fato esse comprovado pela presença de interação significativa entre os fatores treino e BA. O aumento de TNF- α em animais que receberam injeções do oligômeros de BA já havia sido descrito na literatura (PAN, ZHU, *et al.*, 2011). Contudo, até o presente momento ainda não havia sido descrito o efeito do treino – no caso em tarefa no LAM – no aumento dos níveis de TNF- α do hipocampo, induzidos por BA. Interessante destacar que o treino apresentou efeito diferente quando se compara esses

efeitos sobre a concentração de IL-10 e TNF- α . Essa maior sensibilidade do TNF- α aos efeitos do treino, comparado com IL-10 poderia ser explicada por uma possível interação do sistema de produção de TNF- α com os sistemas modulatórios glutamatérgicos e GABAérgicos. Essa hipótese é corroborada com os dados obtidos nas análises de regressão linear. No presente estudo, foi verificada uma relação significativa entre os níveis de TNF- α do hipocampo e os níveis de ativação dos sistemas excitatórios (glutamatérgicos) e inibitórios (GABAérgicos). Essa relação não foi observada para IL-10. A interação entre esses dois sistemas neuroquímicos e os níveis de TNF- α sugere que as diferenças de produção de TNF- α entre os animais com BA com ou sem treino no LAM poderiam estar relacionadas às alterações glutamérgicas e GABAérgicas observadas. Com base nas observações de BEATTIE, STELLWAGEN, *et al.* (2002) e STELLWAGEN e MALENKA, (2006) podemos, por exemplo, supor que a diminuição da concentração de TNF- α nos animais do grupo TB poderia levar essa citocina a concentrações “ideais”, restabelecendo os distúrbios glutamérgicos ocasionados pelo BA. Portanto, o efeito do treino sobre os níveis de TNF- α poderia ser considerado um mecanismo de compensação neural, no qual o SNC do animal estaria compensando de maneira plástica os efeitos deletérios da injeção de BA. Contudo mais estudos são necessários para comprovar experimentalmente essas hipóteses.

Ainda com relação à concentração de citocinas, o treinamento no LAM foi capaz de gerar um aumento na concentração de IL-1 β , independente da presença ou não de BA. Tal constatação corrobora com os dados obtidos por outros autores que mostraram evidências de um papel da IL-1 β nos processos de memória e aprendizado (YIRMIYA, WINOCUR e GOSHEN, 2002; KRUEGER, 2008). Contudo, devemos considerar que o modelo de treino intensivo no LAM, usado nessa dissertação, não nos possibilita afirmar se o aumento de IL-1 β ocorre em consequência do esforço cognitivo.

Como não foram observados efeitos do treino cognitivo sobre os níveis de nenhuma das citocinas e nem na liberação de neurotransmissores (dados do experimento controle: T *versus* CT), pode ser que os efeitos induzidos pelo treino no LAM, observado sobre os níveis de IL-1 β sejam

efeitos do exercício físico também presentes na tarefa do LAM ou dos dois fatores (treino e exercício) associados.

Por outro lado, com base nos dados obtidos com a técnica de *Luxol Fast Blue*, podemos afirmar que o esforço cognitivo exigido na tarefa do LAM é capaz de gerar um aumento na mielinização de fibras do GD que não é ocasionada somente pelo estresse/exercício físico no LAM. Nesse sentido é interessante notarmos que somente os animais do grupo T apresentaram um aumento de mielinização no hipocampo, enquanto os do grupo TB apresentaram níveis comparáveis aos dos animais controles. Fica assim evidente que os oligômeros de BA são capazes de inibir a mielinização hipocampal gerada pelo esforço cognitivo. Considerando os dados obtidos das análises de regressão, relatados abaixo, pode-se considerar a possibilidade desse efeito envolver os sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos. Tal resultado vai de encontro com as observações de HORIUCHI, MAEZAWA, *et al.* (2012) que mostram que os oligômeros de BA são citotóxicos para oligodendrócitos maduros e impedem a formação das camadas de mielina em torno dos axônios.

Considerando os resultados das análises de regressão linear, que foram significativos, podemos propor que as citocinas estudadas, em especial o TNF- α , parecem ter um papel na regulação de sistemas de neurotransmissão do SNC, no caso os sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos. Por sua vez a produção de neurotransmissores, como o GABA e o glutamato, influencia em parâmetros estruturais do SNC, como por exemplo a mielinização do hipocampo. Sendo assim, em fenômenos fisiológicos como o de aprendizado/memória o sistema imune e o SNC trabalhariam em conjunto para possibilitar as alterações estruturais decorrentes do, ou necessárias para aquisição e/ou consolidação e/ou recuperação da informação nesses processos cognitivos. Da mesma maneira em eventos patológicos, com o acúmulo de BA, esses dois sistemas funcionais contribuiriam conjuntamente para compensar as alterações ocasionadas pela doença. Como a DA é capaz de alterar o funcionamento de ambos os sistemas, torna-se claro a razão pela qual o DA é uma doença tão severa com sintomas clínicos tão deletérios.

Por fim, destacamos a relevância da relação significativa observada entre área de núcleo

celulares no GD e os níveis de GABA e glutamato liberados em meio normal ou despolarizante. Tal análise nos mostra a importância de se considerar as interfaces entre os sistemas neuroquímicos que funcionam em rede, quando se estuda o SNC, uma vez que nenhum parâmetro neuroquímico por si só foi capaz de explicar essa relação. Nesse sentido as alterações morfológicas detectadas na área de núcleo das células do GD do hipocampo só podem ser explicadas quando consideramos pelo menos dois dos sistemas regulatórios – glutamatérgicos e GABAérgico. Foi observado que o aparecimento de novas células neuronais no GD possui um papel importante no controle da atividade sináptica hipocampal (Lacefield, Itskov, Reardon, Hen, & Gordon, 2012). Com base nessa observação podemos supor que a relação entre área de núcleo celulares no GD e os parâmetros neuroquímicos avaliados no presente estudo, podem ser devido a eventos de neurogênese, que estariam regulando atividades sinápticas de neurônios hipocampais. Contudo, estudos delineados com o propósito de comprovar essa hipótese são necessários.

Bibliografia

- Antonucci, F., Alpar, A., Kacza, J., Caleo, M., Verderio, C., Giani, A., et al. (2012). Cracking Down on Inhibition: Selective Removal of GABAergic Interneurons from Hippocampal Networks. *J Neurosci*, *32*(6), 1989-2001.
- Apelt, J., & Schliebs, R. (2001). Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res*, *894*(1), 21-30.
- Barten, D. M., & Albright, C. F. (2008). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, *37*(2-3), 171-186.
- Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Zastrow, M. V., et al. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science*, *295*(5563), 2282-2285.
- Belarbi, K., Jopson, T., Tweedie, D., Arellano, C., Luo, W., Greig, N. H., et al. (2012). TNF- α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, *9*(1), 23.
- Brickley, S. G., & Mody, I. (2012). Extrasynaptic GABA(A) Receptors: Their Function in the CNS and Implications for Disease. *Neuron*, *73*(1), 23-34.
- Brito-Moreira, J., Paula-Lima, A. C., Bomfim, T. R., Oliveira, F. B., Sepúlveda, F. J., {De, F. G., et al. (2011). A β oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. *Curr Alzheimer Res*, *8*(5), 552-562.
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D. S., Liu, Y., Fong, D. M., Young, D., et al. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet*, *36*(8), 827-35.
- Clark, R. E., Broadbent, N. J., & Squire, L. R. (2005). Impaired remote spatial memory after hippocampal lesions despite extensive training beginning early in life. *Hippocampus*, *15*(3), 340-346.
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, *19*, R12-20.
- Członkowska, A., & Kurkowska-Jastrzębska, I. (2011). Inflammation and gliosis in neurological diseases--clinical implications. *J Neuroimmunol*, *231*(1-2), 78-85.
- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Baker, L. K., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*, *277*(35), 32046-32053.
- Desai, M. K., Guercio, B. J., Narrow, W. C., & Bowers, W. J. (2011). An Alzheimer's

disease-relevant presenilin-1 mutation augments amyloid-beta-induced oligodendrocyte dysfunction. *Glia* , 59 (4), 627-640.

Desai, M. K., Mastrangelo, M. A., Ryan, D. A., Sudol, K. L., Narrow, W. C., & Bowers, W. J. (2010). Early oligodendrocyte/myelin pathology in Alzheimer's disease mice constitutes a novel therapeutic target. *Am J Pathol* , 177 (3), 1422-1435.

Engmann, O., Hortobágyi, T., Thompson, A. J., Guadagno, J., Troakes, C., Soriano, S., et al. (2011). Cyclin-dependent kinase 5 activator p25 is generated during memory formation and is reduced at an early stage in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* , 70 (2), 159-168.

Ferri, C. P., Sousa, R., Albanese, E., Ribeiro, W. S., & Honyashiki, M. (2009). *Relatório sobre a Doença de Alzheimer no Mundo · Resumo Executivo*. (M. Prince, & J. Jackson, Eds.) Alzheimer's Disease International.

Field, A. (2005). *Discovering Statistics using SPSS* (2 ed.). (D. B. Wright, Ed.) SAGE Publications.

Fields, R. D. (2010). Neuroscience. Change in the brain's white matter. *Science* , 330 (6005), 768-769.

Freitas-Silva DM, R. L. (julho de 2010). Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring. *Behav Brain Res.* , 211, pp. 33-40.

Gibertini, M., Newton, C., Friedman, H., & Klein, T. W. (1995). Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1-beta. *Brain Behav Immun* , 9 (2), 113-128.

Gonzalez-Burgos, G., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2011). GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural Plast* , 2011, 723184.

Granic, I., Nyakas, C., M, P. G., M, U. L., Halmy, L. G., Gross, G., et al. (2010). Calpain inhibition prevents amyloid-beta-induced neurodegeneration and associated behavioral dysfunction in rats. *Neuropharmacology* , 59 (4-5), 334-342.

Guo, F., Zhang, J., Zhu, X., Cai, R., Zhou, X., & Sun, X. (Jan de 2012). Auditory discrimination training rescues developmentally degraded directional selectivity and restores mature expression of GABA(A) and AMPA receptor subunits in rat auditory cortex. *Behav Brain Res* .

Horiuchi, M., Maezawa, I., Itoh, A., Wakayama, K., Jin, L.-W., Itoh, T., et al. (2012). Amyloid β 1-42 oligomer inhibits myelin sheath formation in vitro. *Neurobiol Aging* , 33 (3), 499-509.

Hou, L., Liu, Y., Wang, X., Ma, H., He, J., Zhang, Y., et al. (2011). The effects of amyloid-

β 42 oligomer on the proliferation and activation of astrocytes in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* , 47 (8), 573-580.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology*. (G. Science, Ed.)

Jiang, W., Yu, Q., Gong, M., Chen, L., Wen, E. Y., Bi, Y., et al. (Feb de 2012). Vitamin A deficiency impairs postnatal cognitive function via inhibition of neuronal calcium excitability in hippocampus. *J Neurochem* .

Johnstone, T. B., Gu, Z., Yoshimura, R. F., Villegier, A.-S., Hogenkamp, D. J., Whittemore, E. R., et al. (2011). Allosteric modulation of related ligand-gated ion channels synergistically induces long-term potentiation in the hippocampus and enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther* , 336 (3), 908-915.

Klein, W. L. (2002). Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* , 41, 345-352.

Komitova, M., Perfilieva, E., Mattsson, B., Eriksson, P. S., & Johansson, B. B. (2006). Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Exp Neurol* , 199 (1), 113-121.

Krantic, S., Isorce, N., Mechawar, N., Davoli, M. A., Vignault, E., Albuquerque, M., et al. (Jan de 2012). Hippocampal GABAergic Neurons are Susceptible to Amyloid- β Toxicity in vitro and are Decreased in Number in the Alzheimer's Disease TgCRND8 Mouse Model. *J Alzheimers Dis* .

Krueger, J. M. (2008). The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des* , 14 (32), 3408-3416.

Kutlán D, M.-P. I. (Feb de 2003). New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. Analysis of wine, beer and vinegar. *J Chromatogr A* , 987(1-2), pp. 311-22.

Lacefield, C. O., Itskov, V., Reardon, T., Hen, R., & Gordon, J. A. (2012). Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus* , 22 (1), 106-116.

Li, S., Hong, S., Shepardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M., & Selkoe, D. (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* , 62 (6), 788-801.

Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N. E., Shankar, G. M., & Selkoe, D. J. (2011). Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving

excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci* , 31 (18), 6627-6638.

Liao, M.-C., Hoos, M. D., Aucoin, D., Ahmed, M., Davis, J., Smith, S. O., et al. (2010). N-terminal domain of myelin basic protein inhibits amyloid beta-protein fibril assembly. *J Biol Chem* , 285 (46), 35590-35598.

Lindner, M. D., & Schallert, T. (1988). Aging and atropine effects on spatial navigation in the Morris water task. *Behav Neurosci* , 102 (5), 621-634.

Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., & Barbeito, L. (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* , 32 (5), 367-381.

Mao, X., Ji, C., Sun, C., Cao, D., Ma, P., Ji, Z., et al. (2012). Topiramate attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via activating GABAergic signaling and inhibiting astrogliosis. *Neurochem Int* , 60 (1), 39-46.

Medeiros, R., S., R. D., Passos, G. F., Pandolfo, P., Duarte, F. S., Franco, J. L., et al. (2007). Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci* , 27 (20), 5394-5404.

Mengerink Y, K. D.-P. (Mar de 2002). Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents. High-performance liquid chromatograp. *J Chromatogr A* , 949(1-2), pp. 99-124.

Milgram, N. W., Siwak-Tapp, C. T., Araujo, J., & Head, E. (2006). Neuroprotective effects of cognitive enrichment. *Ageing Res Rev* , 5 (3), 354-369.

Miller, N. E. (1964). Some psychophysiological studies of motivation and of the behavioural effects of illness. *Bulletin of the British Psychological Society* , 17, 1-20.

Molnár, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol* , 22 (5), 506-513.

Moon, M. L., McNeil, L. K., & Freund, G. G. (2011). Macrophages make me sick: how macrophage activation states influence sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology* , 36 (10), 1431-1440.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* , 11 (1), 47-60.

Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2009). The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol* , 89 (4), 369-382.

Oitzl, M. S., Oers, H., Schöbitz, B., & de, E. R. (1993). Interleukin-1 beta, but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. *Brain Res*, *613* (1), 160-163.

Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2011). Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Mol Neurodegener*, *6*, 55.

Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci*, *13*, 812-818.

Pan, X.-D., Zhu, Y.-G., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q.-Y., Huang, H.-P., et al. (2011). Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, *6*, 45.

Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate*. (P. Back, Ed.) New York: Academic Press.

Pires, R. G., C., S. R., Oliveira-Silva, I. F., Franco, G. C., & Ribeiro, A. M. (2005). Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Behav Brain Res*, *162* (1), 11-21.

Pires, R. G., Pereira, S. R., Pittella, J. E., Franco, G. C., Ferreira, C. L., Fernandes, P. A., et al. (2001). The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. *Pharmacol Biochem Behav*, *70* (2-3), 227-235.

Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C., & Maccioni, R. B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res*, *295* (1), 245-257.

Rahn, K. A., Slusher, B. S., & Kaplin, A. I. (Feb de 2012). Glutamate in CNS Neurodegeneration and Cognition and its Regulation by GCPII Inhibition. *Curr Med Chem*.

Rammes, G., Hasenjäger, A., Sroka-Saidi, K., Deussing, J. M., & Parsons, C. G. (2011). Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of β -amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology*, *60* (6), 982-990.

Ribizzi, G., Fiordoro, S., Barocci, S., Ferrari, E., & Megna, M. (2010). Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations. *Neurol Sci*, *31* (3), 321-325.

Ricci, L., Valoti, M., Sgaragli, G., & Frosini, M. (Jun de 2011). Taurine-like GABA

aminotransferase inhibitors prevent rabbit brain slices against oxygen-glucose deprivation-induced damage. *Amino Acids* .

Richwine, A. F., Sparkman, N. L., Dilger, R. N., Buchanan, J. B., & Johnson, R. W. (2009). Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* , 23 (6), 794-802.

Rodriguez-Kern, A., Gegelashvili, M., Schousboe, A., Zhang, J., Sung, L., & Gegelashvili, G. (2003). Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, up-regulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF-kappaB. *Neurochem Int* , 43 (4-5), 363-370.

Ryu, J. K., & McLarnon, J. G. (2008). Thalidomide inhibition of perturbed vasculature and glial-derived tumor necrosis factor-alpha in an animal model of inflamed {A}lzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* , 29 (2), 254-66.

Saar, D., Reuveni, I., & Barkai, E. (2012). Mechanisms underlying rule learning-induced enhancement of excitatory and inhibitory synaptic transmission. *J Neurophysiol* , 107 (4), 1222-1229.

Saresella, M., Calabrese, E., Marventano, I., Piancone, F., Gatti, A., Alberoni, M., et al. (2011). Increased activity of Th-17 and Th-9 lymphocytes and a skewing of the post-thymic differentiation pathway are seen in Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun* , 25 (3), 539-547.

Sondag, C. M., Dhawan, G., & Combs, C. K. (2009). Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation* , 6, 1.

Sperling, R. A., Laviolette, P. S., O'Keefe, K., O'Brien, J., Rentz, D. M., Pihlajamaki, M., et al. (2009). Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron* , 63 (2), 178-188.

Stanley, E. M., Wilson, M. A., & Fadel, J. R. (Jan de 2012). Hippocampal neurotransmitter efflux during one-trial novel object recognition in rats. *Neurosci Lett* .

Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature* , 440 (7087), 1054-1059.

Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., & Malenka, R. C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* , 25 (12), 3219-3228.

Stern, Y. (2009). Cognitive reserve. *Neuropsychologia* , 47, 2015-2028.

Stine, W., Snyder, S. W., Lador, U. S., Wade, W. S., Miller, M. F., Perun, T. J., et al. (1996). The nanometer-scale structure of amyloid-beta visualized by atomic force

microscopy. *J Protein Chem* , 15 (2), 193-203.

Stine,, W. B., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2003). In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* , 278 (13), 11612-11622.

Sul, A. M. (Ed.). (1994). *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*. Associação Americana de Psiquiatria.

Vas, C. J., Rajkumar, S., Tanyakitpibal, P., & Chandra, V. (2001). *ALZHEIMER'S DISEASE : The Brain Killer* (Vol. 1). World Health Organization.

Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* , 44 (1), 181-193.

Watabe, S., Yamaguchi, H., & Ashida, S. (1993). DM-9384, a new cognition-enhancing agent, increases the turnover of components of the GABAergic system in the rat cerebral cortex. *Eur J Pharmacol* , 238 (2-3), 303-309.

Waters, J. (2010). The concentration of soluble extracellular amyloid- β protein in acute brain slices from CRND8 mice. *PLoS One* , 5 (12), e15709.

Wyss-Coray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* , 12 (9), 1005-1015.

Yirmiya, R., Winocur, G., & Goshen, I. (2002). Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiol Learn Mem* , 78 (2), 379-389.

Yu, J., Qian, H., Chen, N., & Wang, J.-H. (2011). Quantal glutamate release is essential for reliable neuronal encodings in cerebral networks. *PLoS One* , 6 (9), e25219.

Ziv, Y., & Schwartz, M. (2008). Immune-based regulation of adult neurogenesis: implications for learning and memory. *Brain Behav Immun* , 22 (2), 167-176.