

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA
LABORATÓRIO DE NEUROFISIOLOGIA E NEUROETOLOGIA EXPERIMENTAL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

***EFEITOS DO CONSUMO BAIXO DE ÁLCOOL NA DOENÇA DE ALZHEIMER
RELACIONADA COM RESISTÊNCIA CEREBRAL À INSULINA***

Aluna: Letícia Rossi

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco

Co-orientadora: Suélen Santos Alves (Doutoranda)

RIBEIRÃO PRETO - SP

DEZEMBRO 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela bênção da vida que me permite evoluir e prosperar.

À minha querida família, em especial meus pais **Ana Lúcia, Edivaldo, Adriano e Ana Paula**, que por toda a vida foram minha principal fonte de incentivo e apoio, e sem os quais eu não estaria onde estou hoje. Obrigada pelos sacrifícios e pelo imenso amor.

À minha querida amiga de infância e irmã de outras vidas, **Larissa**, por ser minha fonte de luz em tantos momentos difíceis e minha parceira em momentos felizes.

Às minhas amigas de minha cidade natal, pelo grande apoio e amizade e por serem parte importante da minha jornada.

Aos meus queridos colegas de turma, em especial **Maria Vitória, Carina, Gabrielle, Matheus e Luísa**. Vocês fizeram parte da época mais intensa da minha vida, e agradeço imensamente por todos os momentos mais do que especiais que compartilhamos.

À minha parceira, **Glaucia**, a qual foi responsável por acalmar tantas crises, por dar luz a problemas que pareciam não ter solução, por estar ao meu lado nas dificuldades e alegrias, por acreditar em mim como ninguém e por me ajudar a acreditar em mim mesma. Obrigada por tanto apoio e companheirismo.

Ao meu orientador, **Norberto Garcia-Cairasco**, pelo apoio e incentivo imensuráveis que foram essenciais para meu crescimento enquanto cientista e pessoa. Admiro imensamente seu profissionalismo e sua bondade. Obrigada pelo exemplo que me fornece, tanto profissional quanto pessoal, pela sua dedicação e pelo voto de confiança.

À minha co-orientadora, **Suélen Alves**, que me acolheu como família e me ensinou tanto. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos, pelos momentos compartilhados e por tanto apoio. Você é um grande exemplo para mim, tenho muito orgulho de ser sua “pupila”.

Aos todos os meus colegas do LNNE, em especial **Gabriel e Mariana**, que sempre estiveram ao meu lado no dia a dia de uma cientista e graduanda, que não é fácil, e me deram tanto apoio. Vocês são parte da minha história.

Aos técnicos **José Antônio, Flávio Del Vecchio e Rubens Melo**, sem os quais esse trabalho não teria se concretizado. Seu apoio e amizade foram essenciais.

Ao professor **Adriano Silva Sebollela** e aos membros de seu laboratório, em especial **Giovanna**, pela colaboração e grande suporte científico.

Ao professor **Sebastião de Sousa Almeida** e membros do seu laboratório, especialmente **Rodrigo Focosi Mazzei**, pela disposição, ensinamentos e amizade.

À **Universidade de São Paulo**, pelo suporte científico, em especial ao **Curso de Ciências Biomédicas**, pela formação de cientistas capacitados e seres pensantes. A todos os meus professores, muito obrigada.

À **Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela bolsa de Iniciação Científica a mim concedida.

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63^a Sessão Ordinária, realizada em 31/10/2022.

ABREVIACÕES

ApoE: Apolipoproteína E

APP: *Amyloid Precursor Protein* (proteína precursora amilóide)

A β : beta-amilóide

BACE-1: Beta-secretase 1

DA: Doença de Alzheimer

DAe: Doença de Alzheimer esporádica

DAf: Doença de Alzheimer familiar

DM: *Diabetes Mellitus*

FDA: *Food and Drug Administration*

FOX: *Forkhead box*

GSK-3: glicogênio sintase quinase 3

icv: intracerebroventricular

ip: intraperitoneal

IR: receptor de insulina

IRS: substrato de receptor de insulina

LAM: Labirinto Aquático de Morris

MAP: proteína associada a microtúbulo

mTORC1: *mammalian target of rapamycin complex 1*

NMDA: N-Metil-D-aspartato

pAkt: *Akt* fosforilada

PI3K: Fosfoinosídeo 3-quinase

PKB (AKT): proteína quinase B

Psen1 e psen2: presenilina-1 e presenilina-2

Q1: quadrante 1

Q2: quadrante 2

Q3: quadrante 3

Q4: quadrante 4

STZ: estreptozotocina

tAkt: *Akt* total

WAR: *Wistar Audiogenic Rat*

WB: *Western Blot*

Wnt: *Wingless-related integration site*

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. A Doença de Alzheimer	8
1.2. Relação entre Doença de Alzheimer e Diabetes Mellitus.....	13
1.3. Álcool e seus efeitos na DA e comorbidades associadas.....	17
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Abordagens experimentais.....	25
3.2 Delineamento Experimental.....	25
3.3 Infusão de Drogas.....	27
3.4 Ingestão de Etanol.....	28
3.5 Teste para verificação da memória espacial.....	28
3.6 Western Blotting.....	31
3.6.1 Preparo do homogenato cerebral de rato.....	31
3.6.2 SDS-PAGE e Transferência.....	32
3.6.3 Bloqueio, incubação com anticorpos e revelação.....	32
3.7 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	35
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa com impacto negativo nos processos de cognição e memória, cujos principais biomarcadores mais estudados são as placas de peptídeo beta-amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares resultantes da hiperfosforilação da proteína *tau*. Achados adicionais sugestivos de alterações na regulação cerebral da via de sinalização da insulina na DA tem contribuído para que autores a considerem como um terceiro tipo de diabetes ou diabetes *mellitus* tipo 3 (DMT3). Embora a DA ainda se apresente com uma etiologia complexa e em muitos casos indefinida, estudos sugerem que hábitos de vida são fatores de risco que influenciam no desenvolvimento da doença. Nesse sentido, o álcool, droga lícita mais consumida no mundo, parece apresentar efeitos benéficos sobre o declínio cognitivo da doença, quando consumido em quantidades baixas ou moderadas. Apesar dos resultados ainda serem controversos e os mecanismos responsáveis por esses efeitos ainda não estarem elucidados, diversos estudos já demonstraram que o consumo baixo de álcool é capaz de aumentar a sensibilidade insulínica periférica. Dessa forma, considerando que haveria uma importante conexão entre DA e resistência cerebral à insulina, nossa hipótese é que o consumo baixo de álcool é capaz de atenuar alterações de memória na DA por meio do aumento da sensibilidade cerebral à insulina. O objetivo do trabalho foi analisar os efeitos do consumo baixo de álcool sobre o declínio cognitivo e regulação cerebral da via de sinalização da insulina apresentados em dois modelos de DA esporádica. Para isso, inicialmente foram utilizados ratos machos da linhagem *Sprague-Dawley*, divididos em: grupo Controle (*naïve*), e grupo que foi submetido à injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ), considerado um modelo de DA esporádica induzido por desregulação da via de sinalização da insulina cerebral. Também foram utilizados animais da linhagem *Wistar Audiogenic Rat* (WAR), que embora tenham sido geneticamente selecionados para o estudo das epilepsias, também apresentam comprometimento de memória, hiperfosforilação da proteína *tau* e alterações sugestivas de resistência cerebral à insulina. Animais dos grupos STZ e WAR foram tratados com etanol 3% ou com água por 4 semanas e, em seguida, submetidos ao Labirinto Aquático de Morris (LAM) para avaliação da memória espacial. Os resultados obtidos mostraram que animais injetados com STZ e os WARs tiveram um pior desempenho no LAM nos dias de treinamento e de teste, quando comparados aos animais dos grupos Controle, o que sugere comprometimento de aprendizado e memória. Não observamos diferença significativa

para a latência entre os animais tratados com água ou com álcool. Entretanto, nos animais injetados com STZ, o grupo tratado com álcool apresentou maior velocidade de natação durante o LAM em relação aos animais que receberam apenas água. A fim de verificar a ativação hipocampal da via de sinalização da insulina, analisamos também os níveis da proteína *Akt* total e sua forma fosforilada (serina 473) no hipocampo dos animais. Identificamos um aumento dos níveis da proteína *Akt* fosforilada em animais WAR que receberam apenas água em relação aos Controle. Entretanto, não observamos diferença significativa entre os grupos que receberam álcool e água. Assim, confirmamos que os modelos experimentais de DA: STZ e WAR apresentam alterações de memória (LAM) e, no caso dos WARs, detectamos uma alteração endógena da *Akt* fosforilada hipocampal. Concluímos, entretanto, que o tratamento com álcool 3% por 4 semanas não foi capaz de atenuar as alterações de memória (LAM) ou moleculares (*Akt*) detectadas nos modelos animais de DA STZ e WAR.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Resistência à Insulina; Álcool; Memória; Diabetes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Alzheimer

Atualmente, aproximadamente 55 milhões de pessoas vivem com algum tipo de demência, e estima-se que esse número aumente para 139 milhões até 2050 (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2022). A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, responsável por aproximadamente 60-80% dos casos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022). Devido ao comprometimento da funcionalidade e qualidade de vida do portador, a DA torna-se uma desordem de grande impacto para a família do paciente, exigindo maior atenção e cuidado. O estudo de Veras e colaboradores, ao analisar o impacto financeiro para o cuidado de um idoso com demência no Brasil, concluiu que em média 66% da renda familiar é voltada para as necessidades do paciente e, quando a demência é associada com outra doença crônica, essa porcentagem sobe para 80% (VERAS et al., 2007). Os dados alertam para a busca de novos métodos de tratamento e prevenção, já que a DA é uma doença neurodegenerativa progressiva e atualmente sem cura (LAO et al., 2019).

A DA foi descoberta em 1901, quando o psiquiatra alemão Alois Alzheimer investigava um caso de uma paciente hospitalizada após apresentar alterações comportamentais que, posteriormente, evoluíram para uma perda rápida e progressiva de memória (MÖLLER; GRAEBER, 1998). A paciente Auguste Deter (1850 – 1906) apresentava um quadro de declínio cognitivo progressivo, com distúrbios de linguagem e comportamento. Após sua morte, Alois Alzheimer realizou análises histológicas no cérebro da paciente e observou uma atrofia cerebral difusa, intensa degeneração de neurônios e a presença de “placas” e “fibrilas” (MÖLLER; GRAEBER, 1998). Esses achados viriam a ser, com estudos posteriores de novos casos semelhantes ao de Auguste, os principais marcadores da doença. Assim, a doença, para a qual foi dada o nome do médico Alzheimer, foi caracterizada como um tipo de demência senil. Ao longo das

últimas décadas, sua neuropatologia foi, e continua sendo aprofundada e redescoberta, mas ainda não foi completamente elucidada.

Hoje, os principais sintomas da DA são caracterizados principalmente por declínios na função cognitiva, como perda de memória, confusão e alterações na linguagem. Entretanto, pacientes com DA também podem apresentar alterações no comportamento e personalidade, como agressividade, depressão e ansiedade (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022). Os principais biomarcadores da DA ainda são os mesmos descritos por Alois Alzheimer há mais de um século: o acúmulo do peptídeo beta-amiloide (*amyloid beta* - A β), que se agregam formando as denominadas placas de A β , e emaranhados neurofibrilares, formados pela agregação intracelular da proteína *tau*, além de morte neuronal (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022).

O peptídeo A β é produzido por meio de clivagens de um precursor maior, a A β PP (*Amyloid Precursor Protein* – A β PP) (HARDY; HIGGINS, 1992). O metabolismo da A β PP pode seguir duas vias: a amilodoigênica e a não-amilodoigênica (Fig. 1). Na via não-amilodoigênica, esse precursor é clivado pelas enzimas α e γ -secretase, gerando proteínas solúveis derivadas do APP. Já na via amilodoigênica, essas clivagens se dão primeiramente pela enzima β -secretase (BACE-1), seguida pela enzima γ -secretase, dando origem ao peptídeo A β , que, devido à sua característica hidrofóbica, é susceptível à formação de aglomerados (BARANELLO et al., 2015). Quando se apresentam em quantidades anormais, os peptídeos A β formam oligômeros que agregam-se no meio extracelular, formando agregados fibrilares que depositam-se em placas de A β , responsáveis por promover um ambiente neurotóxico e comprometer as sinapses (SELKOE, 1993).

Outro biomarcador da DA é a proteína *tau* hiperfosforilada (Fig. 1). A proteína *tau* faz parte do grupo das proteínas associadas a microtúbulos (MAPs) (KOSIK; JOACHIM;

SELKOE, 1986) e desempenha um importante papel na montagem do citoesqueleto celular. Entretanto, por se tratar de uma fosfoproteína, suas funções são reguladas pelo seu nível de fosforilação. Na DA, essa proteína pode apresentar-se hiperfosforilada, perdendo, assim, sua competência de interação com os microtúbulos do citoesqueleto. Além disso, quando hiperfosforilada, a proteína *tau* tende a se aglomerar e formar agregados de neurofilamentos no citoplasma, que prejudicam as sinapses e resultam em morte neuronal (GRUNDKE-IQBAL; IQBAL; TUNG, 1986).

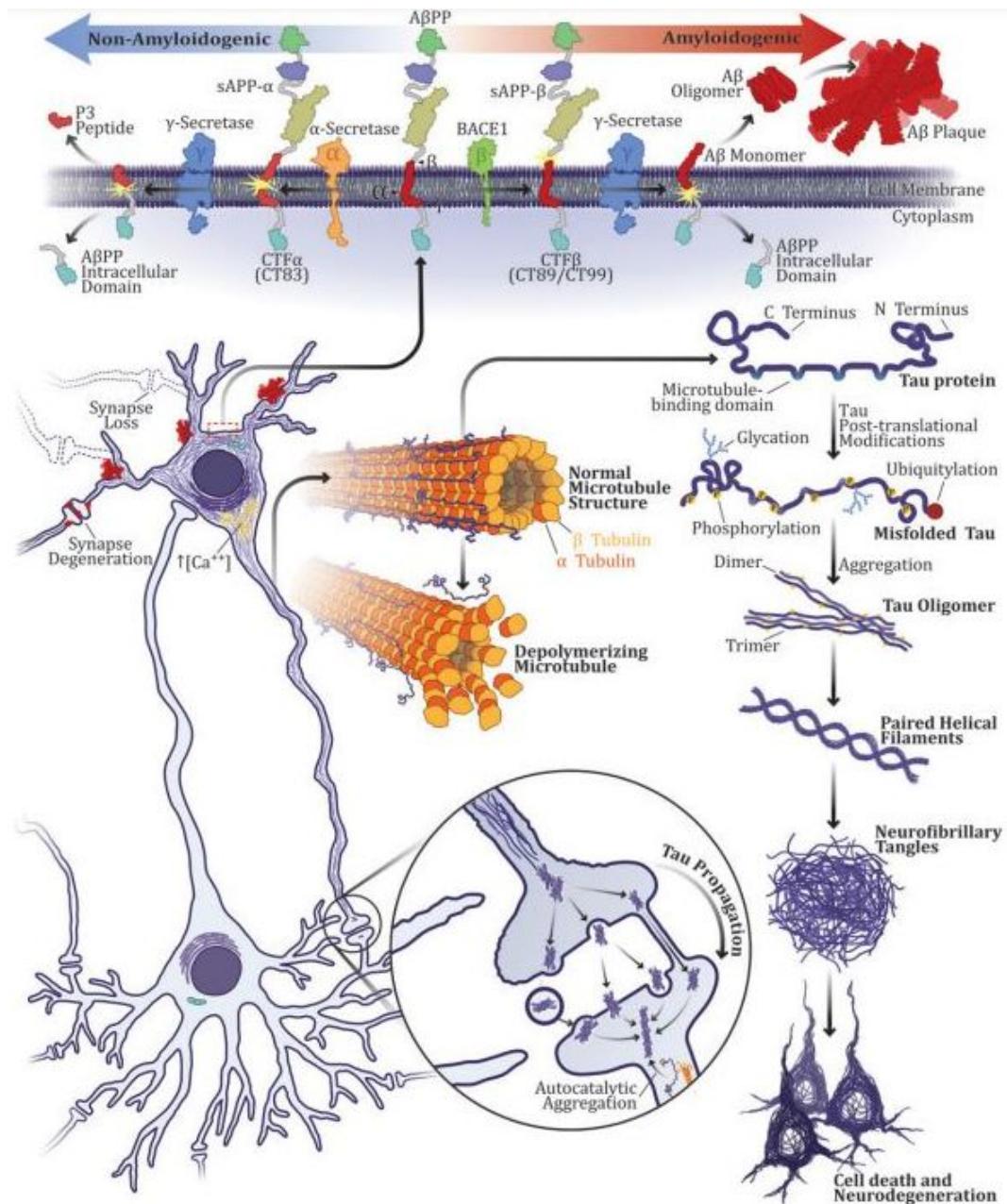


Figura 1. Principais marcadores neuropatológicos da DA, mostrando: formação do peptídeo A β e das placas amilóides; hiperfosforilação de tau e formação dos emaranhados neurofibrilares. Adaptado de: (ALVES et al., 2021).

Em virtude de sua complexidade etiológica, a DA é geralmente dividida em familiar (DAf) e esporádica (DAe). Apenas a minoria dos casos (1-5%) são DAf, ou seja, possuem mutação autossômica dominante que permite estabelecer uma causa para o desenvolvimento da doença. Nesses casos, mutações conhecidas como “determinantes” geralmente ocorrem nos genes da A β PP, presenilina-1 (psen1) e presenilina-2 (psen2),

entre outros. A grande maioria dos casos (95%) são, na verdade, de DAe, a qual ainda não apresenta uma causa definida (DORSZEWSKA et al., 2016). No entanto, algumas mutações podem aumentar o risco de desenvolver essa forma da doença. A presença de mutações no gene apoE polimórfico, principalmente no seu alelo e4, por exemplo, é considerada um fator de risco para DAe (FRIDMAN et al., 2004).

Para ambas as formas de DA, não há descrição de cura da doença. Até 2020, a terapêutica da DA era voltada à amenização dos sintomas, como alterações cognitivas, agressividade e agitação. Os medicamentos disponíveis para o tratamento dessa demência resumiam-se aos inibidores de colinesterase (donepezila, rivastigmina e galantamina) e ao agonista de receptor N-Metil-D-aspartato (NMDA), a memantina (CUMMINGS; TONG; BALLARD, 2019). Recentemente, em 2021, um novo medicamento para tratamento da DA foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), o *Aducanumab* (FDA, 2021). Esse fármaco é um anticorpo monoclonal anti- $\text{A}\beta$ e, portanto, caracteriza-se como a primeira droga aprovada pelo FDA com capacidade de atuar na progressão da doença. Entretanto, apesar da sua aprovação, ainda existe um grande debate em relação à sua relevância clínica devido à grande porcentagem de pacientes que apresentam reações adversas graves (edemas e microhemorragias cerebrais), seu alto custo e efeito terapêutico pouco significativo (PADDA; PARMAR, 2021; PERLMUTTER, 2021; RICHARD; DEN BROK; VAN GOOL, 2021).

Embora a DA ainda não apresente causa completamente definida, a hipótese etiológica mais tradicional é a hipótese da cascata amilóide proposta por Hardy e Higgins em 1992 (HARDY; HIGGINS, 1992). De acordo com essa hipótese, a produção anormal do peptídeo $\text{A}\beta$, assim como sua agregação e deposição em placas, seriam os principais agentes desencadeadores da fisiopatologia da DA (HARDY; HIGGINS, 1992). Sendo assim, inúmeras pesquisas se basearam nessa hipótese, incluindo estudos que resultaram

na aprovação do *Aducanumab* (veja acima). Entretanto, após inúmeras falhas em estudos clínicos que levaram ao questionamento do verdadeiro papel do peptídeo A β na fisiopatologia da DA (KEPP, 2017; MAKIN, 2018), outros autores adotaram a hipótese de que, na verdade, a DA se trata de uma doença multifatorial (GONG; LIU; IQBAL, 2018), na qual diversos fatores, como componentes de ambiente e hábitos de vida, poderiam interagir e convergir entre si, resultando em uma única patologia. Portanto, baseando-se nessa hipótese, a DA deve ser investigada como uma doença complexa e com possíveis múltiplos alvos terapêuticos.

1.2 A relação entre Doença de Alzheimer e Diabetes *Mellitus*

Estudos recentes que ratificam a teoria etiológica multifatorial têm sugerido que alterações na regulação da via de sinalização da insulina também estão presentes na fisiopatologia da DA (ALVES et al., 2021; HOYER; LANNERT, 1999; MOLONEY et al., 2010; MONTE; WANDS, 2005; WILLETTE et al., 2013). Corroborando essa hipótese, estudos cognitivos com pacientes com Diabetes *Mellitus* (DM) identificaram alterações precoces de atenção e memória (MILES; ROOT, 1922) e aumento do risco de desenvolvimento de demências em indivíduos diabéticos (HUANG et al., 2014; LEIBSON et al., 1997; OTT et al., 1999; PEILA; RODRIGUEZ; LAUNER, 2002; SCHNAIDER BEERI et al., 2004).

Além disso, foi observada a existência de uma similaridade de marcadores histopatológicos, moleculares e bioquímicos entre a DM tipo 2 (DMT2) e a DA. Processos neuroinflamatórios (VAN DIJK et al., 2015), lesão vascular (HADI; AL SUWAIDI, 2007; JELLINGER; ATTEMS, 2005), estresse oxidativo (VERDILE et al., 2015), hiperfosforilação de *tau* (SCHUBERT et al., 2003), aumento de A β (CRAFT, 2007; JURGENS et al., 2011) e principalmente anormalidades na via de sinalização

insulínica (GOLDSTEIN, 2002) já foram identificados em ambas patologias. Sendo assim, o termo DM Tipo 3 (DMT3) tem sido utilizado recentemente como sinônimo da DA e para referir-se a uma forma de diabetes que ataca seletivamente o cérebro (MONTE; WANDS, 2005). Ao propor esse termo, o grupo liderado por Suzanne De La Monte observou alterações na via de sinalização da insulina no curso inicial da DAe, atribuindo uma possível relação entre essa cascata de proteínas e múltiplos fenômenos patológicos presentes nessa desordem (STEEN et al., 2005).

Fisiologicamente, a insulina atua nos neurônios por meio dos receptores IR (*insulin receptor* - *IR*) localizados especialmente nas membranas sinápticas. Ao se autofosforilarem, os IRs iniciam uma cascata de sinalização interna. Assim, o IR fosforila seus substratos, conhecidos como IRS (*insulin receptor substrate-IRS*). Se esta fosforilação ocorre em um resíduo de tirosina da cadeia do IRS, a via prossegue com a ativação da proteína quinase B (*Akt*) e consequente inibição da glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3). Porém, se a fosforilação ocorre em um resíduo de serina, há inibição da atividade da *Akt* e ativação da GSK-3 (Fig. 2) (CROSS et al., 1995; O'NEILL, 2013; PLUM; SCHUBERT; BRÜNING, 2005; QIAO et al., 1999; WILDEN et al., 1992).

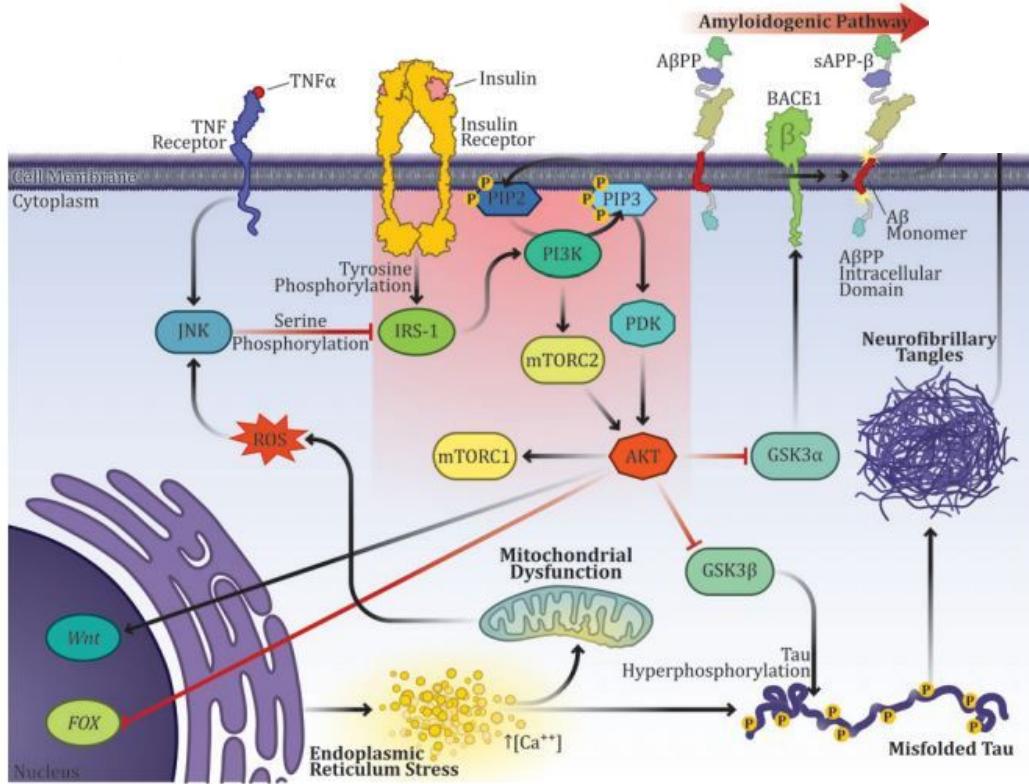


Figura 2. Via de sinalização da insulina cerebral e interações com eventos patológicos da DA. A insulina se liga a seus receptores IR, que então fosforilam seus substratos IRS. Essa fosforilação pode ativar (em resíduo de tirosina) ou inibir (em resíduo de serina) a atividade dos IRS. Com a ativação do IRS, a via segue com a ativação da PI3K e da *AKT*, que então inibe a atividade da GSK-3. Com a inibição do IRS, a *Akt* não é ativada, e não ocorre a inibição da GSK-3. A *Akt* também tem papel em outras vias de sinalização, como *Wnt*, *FOX* e *mTORC1*. A GSK-3, por sua vez, regula a produção do peptídeo *Aβ* (sua isoforma α) e modula a hiperfosforilação da proteína *tau* (sua isoforma β). Adaptado de (ALVES et al., 2021).

A GSK-3 é uma enzima já conhecida e que se tornou alvo no estudo da resistência insulínica e, consequentemente, da DA (ELDAR-FINKELMAN, 2002). Essa quinase participa de diversos processos que envolvem dois principais marcadores da DA, o peptídeo *Aβ* e a proteína *tau* hiperfosforilada. Essas atividades da GSK-3 são dependentes de suas isoformas: a isoforma *alfa* (α) e a *beta* (β). Estudos demonstraram que a isoforma α participa da produção do peptídeo *Aβ* (PHIEL et al., 2003), enquanto a isoforma β medeia a hiperfosforilação de *tau* (Fig. 2) (HANGER et al., 1992; MANDELKOW et al., 1992). A atividade da GSK-3 é diretamente regulada pela *Akt*, uma enzima que também participa de diversos processos envolvidos na manutenção da homeostase, bem como

proliferação e sobrevivência celular (O’NEILL, 2013). Quando a via de sinalização insulínica se encontra ativada, a *Akt* inibe a atividade da GSK-3 α/β através de fosforilação nos resíduos Ser 21 e Ser 9, respectivamente, limitando suas funções na fisiopatologia da DA (ALJANABI et al., 2020). Assim, na DA considerada como DMT3, a regulação da via PI3K/*Akt*/GSK-3 pode se encontrar prejudicada, aumentando a expressão de dois principais biomarcadores patológicos da DA (ALVES et al., 2021; MONTE; WANDS, 2005).

Portanto, alterações na regulação da via de sinalização da insulina, sugestivas de resistência insulínica cerebral, são de extremo prejuízo para o sistema nervoso central, e parecem estar relacionadas com o desenvolvimento da DAe (ARNOLD et al., 2018; BAKER et al., 2012; FRÖLICH et al., 1998; SCHRIJVERS et al., 2010). Corroborando essa hipótese, a estreptozotocina (STZ), uma droga que, quando metabolizada, gera componentes citotóxicos que destroem as células beta-pancreáticas, é capaz de desenvolver um estado de resistência insulínica cerebral e lesão oxidativa suficiente para causar neurodegeneração tipo-DA quando administrada centralmente, incluindo inibição da *Akt* com consequente ativação de GSK-3 β , aumento de *tau* fosforilada, diminuição da insulina ligada ao IR e da expressão de IRS-1 (LESTER-COLL et al., 2006). Entretanto, depósitos de A β podem ser observados com maior clareza apenas após 3 meses da injeção do STZ (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2011).

Outro modelo que apresenta comprometimento de memória e alterações sugestivas de resistência cerebral à insulina é a linhagem *Wistar Audiogenic Rat* (WAR). Essa linhagem foi desenvolvida por nosso grupo e é geneticamente suscetível a crises epilépticas sob estimulação acústica, sendo um importante modelo para o estudo das epilepsias e suas comorbidades (GARCIA-CAIRASCO; UMEOKA; CORTES DE OLIVEIRA, 2017). Além da susceptibilidade às crises, já foram detectadas nos animais

WAR uma série de alterações metabólicas e fisiológicas, como hipertensão arterial (DECHANDT et al., 2019; FAZAN et al., 2011, 2015; UMEOKA et al., 2011), e alterações neuropsiquiátricas (CASTRO et al., 2017; CUNHA et al., 2015; GARCIA-CAIRASCO et al., 1998). Mais recentemente, nosso grupo identificou um fenótipo parcial tipo-DA na linhagem, com achados de alterações comportamentais e moleculares (ALVES et al., 2022). Os animais WAR apresentaram comprometimento no aprendizado e na memória espacial, avaliados pelo teste Labirinto Aquático de Morris (LAM), hiperfosforilação de *tau* hipocampal e alterações hipocampais na via de sinalização da insulina sugestivas de resistência cerebral insulínica, detectadas pelos menores níveis de IRS e aumento da fosforilação da proteína GSK-3 α/β . Dessa forma, apesar de não apresentar todos os componentes já identificados na fisiopatologia da DA, a linhagem WAR possui marcadores neuropatológicos e alterações comportamentais típicos da DA esporádica, o que sugere uma possível conexão entre epilepsia, resistência à insulina e DA (ALVES et al., 2022).

A DA, portanto, é associada a diversas outras comorbidades, bem como a DM já mencionada, e outros múltiplos fatores que influenciam seu desenvolvimento e progressão, como, por exemplo, hábitos de vida (ALVES et al., 2021; DE LA MONTE; TONG; WANDS, 2018). Dieta e alimentação, prática de exercícios físicos, tabagismo, consumo de álcool, e a qualidade de vida de um indivíduo em geral são fatores de risco modificáveis que influenciam no desenvolvimento da DA (FLICKER, 2010). Sendo assim, torna-se necessário o melhor entendimento dos efeitos desses hábitos no desenvolvimento e prognóstico da doença.

1.3 Álcool e seus efeitos na DA e comorbidades associadas

Nesse sentido, curiosamente, o álcool, droga lícita mais consumida no Brasil e no mundo (FIOCRUZ, 2017) parece apresentar potenciais efeitos benéficos na DA quando consumido em doses baixas ou moderadas (ANSTEY; PETERS, 2018; BACHMAN et al., 2003; DENG et al., 2006; HALL et al., 2006; HEYMANN et al., 2016; HUANG et al., 2002; KOK et al., 2016; LINDSAY et al., 2002; SABIA et al., 2018). Huang e colaboradores relataram que o consumo leve a moderado de álcool, por exemplo, está relacionado com uma menor incidência de demência e DA em idosos (HUANG et al., 2002).

Em estudos experimentais, os resultados sugerem possíveis efeitos benéficos do etanol em quantidades baixas na fisiopatologia da DA, através da supressão da neuroinflamação causada pelo acúmulo de proteínas amiloidogênicas (COLLINS et al., 2010) e da proteção contra a neurotoxicidade de A β em cultura de células (BATE; WILLIAMS, 2011; BELMADANI et al., 2004). Também já foi demonstrado que baixas concentrações de etanol induzem melhorias em processos de aprendizado e memória em um modelo animal transgênico da DA, além de diminuir a agregação de A β (MUÑOZ et al., 2015). Em um estudo clínico, indivíduos que consumiam álcool com baixa frequência, possuíam menores quantidades de *tau* fosforilada e anormalidades na *tau* total no fluido cerebrospinal quando comparados aos que consumiam com maior frequência (WANG et al., 2021).

Ainda assim, apesar de muito promissores, os resultados ainda são contraditórios, visto que alguns estudos clínicos não observaram nenhum efeito do consumo de álcool na DA (BROE et al., 1998; HEBERT et al., 1992; LUCHSINGER et al., 2004; RÄIHÄ et al., 1998; ROSEN et al., 1993; TSOLAKI et al., 1997; YOSHITAKE; KIYOHARA; KATO, 1995) ou relataram efeitos deletérios (FRATIGLIONI et al., 1993; FREUND; BALLINGER, 1992; HARWOOD et al., 2010; LUKOYANOV et al., 2000;

SCHWARZINGER et al., 2018). Essas divergências parecem estar relacionadas com diferentes padrões de consumo de álcool.

O consumo baixo ou moderado de álcool também está associado com uma menor incidência de doenças cardiovasculares (DOLL et al., 1994; KANNEL; ELLISON, 1996; MICHAEL GAZIANO et al., 2000), uma das principais comorbidades da DA (BARON, 2002; LIMA et al., 2009). Nesses casos, o efeito do álcool parece estar relacionado com uma diminuição da resistência à insulina sistêmica e, consequentemente, menor risco de desenvolvimento de comorbidades cardiovasculares (NANCHAHAL; ASHTON; WOOD, 2000; RIMM et al., 1991). Por outro lado, uma maior mortalidade por doença cardiovascular não coronariana, cardiopatia isquêmica, câncer e outras causas foi associada a indivíduos que nunca ou raramente consomem álcool (DOLL et al., 1994; MICHAEL GAZIANO et al., 2000). Flanagan e Moore (2000) demonstraram que o consumo de álcool em quantidades moderadas na dieta apresenta efeitos cardioprotetores. Esses efeitos estão relacionados ao aumento da sensibilidade à insulina sistêmica promovido pelo etanol. Entretanto, quando o consumo é excessivo, o efeito é inverso, ou seja, há diminuição da sensibilidade à insulina (FLANAGAN et al., 2000). Esse padrão de efeito sobre a resistência à insulina também já foi observado em vários outros estudos (FACCHINI; CHEN; REAVEN, 1994; KIECHL et al., 1996; LAZARUS; SPARROW; WEISS, 1997; SIERKSMA et al., 2004; VILLEGAS et al., 2004). Dessa forma, diversos autores sugerem uma curva em “U” relacionando a quantidade de álcool consumida com resistência à insulina, sendo o menor valor da resistência na região em que a dose alcoólica é baixa ou moderada (FLANAGAN et al., 2000; VILLEGAS et al., 2004).

Os efeitos positivos de quantidades baixas de etanol também já foram descritos na DM. Estudos clínicos demonstraram que pacientes que consomem álcool moderadamente, ao contrário dos consumidores excessivos, possuem menor risco de

desenvolver DMT2 (CULLMANN; HILDING; ÖSTENSON, 2012; M. WEI, L. GIBBONS, T. MITCHELL, J. KAMPERT, 2000; PIETRASZEK; GREGERSEN; HERMANSEN, 2010). Assim, diversos estudos têm atribuído efeitos positivos ao consumo baixo ou moderado de álcool, promovendo longevidade e diminuição do risco de doenças cardiometabólicas através de um possível aumento da sensibilidade insulínica (AVOGARO et al., 2002; BELL et al., 2000; VASDEV; GILL; SINGAL, 2006)

Corroborando esses achados, um estudo realizado por Furuya e colaboradores (FURUYA; BINSACK; MACHADO, 2003) observou uma relação positiva entre consumo baixo de álcool e sensibilidade à insulina periférica em modelo animal. Foram utilizados ratos Wistar *naïve*, tratados com diferentes concentrações de etanol por 4 semanas *ad libitum* (à vontade). Os resultados mostraram que uma baixa concentração de etanol, mais especificamente 3%, foi capaz de aumentar significativamente a sensibilidade à insulina nesses animais (FURUYA; BINSACK; MACHADO, 2003). Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que o consumo baixo de álcool pode influenciar positivamente a regulação da via de sinalização de insulina sistêmica através de um aumento da fosforilação de IRS-2 e *Akt* no fígado (FURUYA et al., 2005).

Na DA, embora os resultados ainda sejam controversos, já foi observado que pacientes que possuem um histórico de consumo leve ou moderado de álcool apresentam menor declínio cognitivo e uma maior longevidade, enquanto consumidores excessivos parecem apresentar um quadro mais grave de declínio cognitivo e uma progressão mais rápida da doença quando comparados aos consumidores moderados (HEYMANN et al., 2016). Já em relação aos que não consomem álcool, o declínio cognitivo é mais acelerado comparado aos indivíduos que o consomem moderadamente (HEYMANN et al., 2016). Entretanto, não há relatos de estudos que tenham investigado a regulação da via de

sinalização a insulina central como um possível mecanismo responsável por esses efeitos decorrentes do consumo de álcool.

Assim, tendo em vista que o consumo baixo ou moderado de álcool está relacionado com aumento da sensibilidade à insulina periférica e que implicações na via de sinalização insulínica estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento de DA (HOYER; LANNERT, 1999; MONTE; WANDS, 2005; STEEN et al., 2005; WILLETTE et al., 2013), nossa hipótese é de que o consumo baixo de álcool é capaz de aumentar a sensibilidade cerebral à insulina e, portanto, é capaz de atenuar alterações de memória na DA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da ingestão baixa de etanol no processo de aprendizado e memória e na ativação da via de sinalização da insulina em animais cognitivamente saudáveis (Controle) e em dois modelos utilizados para o estudo de DAe: (1) induzido por injeções intracerebroventriculares de STZ e (2) nos animais da linhagem *WAR*.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da ingestão de etanol 3% ou veículo (água) no processo de consolidação da memória espacial de animais *Sprague-Dawley* adultos Controle, animais *Sprague-Dawley* adultos após injeção intracerebroventricular de STZ, e em animais da linhagem *WAR*.
2. Após exposição ao LAM, avaliar os efeitos da ingestão de etanol 3% ou veículo (água) nos níveis de *Akt* e *Akt* fosforilada no hipocampo de animais *Sprague-Dawley* adultos, animais *Sprague-Dawley* adultos após injeção intracerebroventricular de STZ, e em animais da linhagem *WAR*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Abordagens experimentais

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FMRP – USP, número 1024/2021R4, e todas as normas de ética e boas práticas laboratoriais foram estritamente seguidas. 27 ratos *Sprague-Dawley* com 2 meses de idade foram providos pelo Serviço de Biotério do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. 14 ratos *Wistar audiogenic rats* (WAR), de 8 a 12 meses de idade, foram providos pelo Serviço de Biotério de cepas especiais da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Os animais foram armazenados em caixas de polietileno com tampa de ferro cromado (40,5 x 33,5 x 21 centímetros, cm), em grupos de 2-4 ratos por caixa. Os animais foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 horas (h), sob temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C}\pm2^{\circ}\text{C}$, com água e ração *ad libitum*.

3.2 Delineamento Experimental

A escolha e a organização dos grupos experimentais estão descritas na Figura 3.

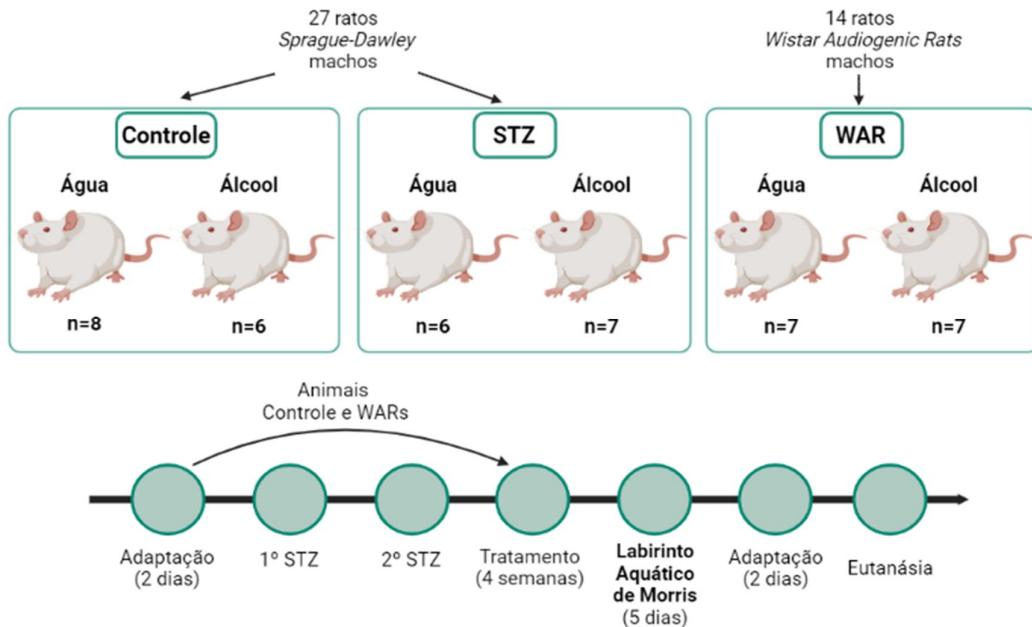


Figura 3. Desenho e representação cronológica do protocolo experimental. Foram selecionados 27 animais machos *Sprague-Dawley* (270-320 g) e 14 animais machos de linhagem WAR. Todos os animais passaram por um período de adaptação de pelo menos dois dias com acesso livre à água e comida. Dentre os animais *Sprague-Dawley*, 13 foram injetados com estreptozenocina (STZ). Todos os animais foram submetidos a um tratamento com etanol 3% (grupo álcool) ou água (grupo água) por 4 semanas. Nos próximos 5 dias, foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris (LAM) para avaliação da memória espacial. Os animais foram eutanasiados 2 dias após o último dia de teste. Após a eutanásia e dissecação dos cérebros, estes foram armazenados para o preparo dos homogenatos de proteínas que foram utilizados para o ensaio de *Western blotting*. Imagem feita em *biorender.com*.

Foram selecionados 41 animais machos para a realização deste estudo, mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP durante os experimentos, sendo estes 27 da linhagem *Sprague-Dawley* e 14 da linhagem WAR. Os ratos *Sprague-Dawley* foram divididos em 2 grupos: grupo Controle (14 animais) e grupo icv-STZ (13 animais). Os animais foram ainda subdivididos em subgrupos: animais que receberam administração oral de etanol 3% (Grupo álcool) e animais que receberam apenas água (Grupo água). Os animais do grupo controle não passaram por nenhuma manipulação prévia.

Os animais do grupo STZ (icv-STZ) foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas bilaterais nos ventrículos laterais direito e esquerdo (coordenadas estereotáxicas: AP= -0,8 mm; ML= 1,7 mm; DV= 3,4 mm) para a injeção da droga que caracteriza o modelo (HOYER; LANNERT, 1999; LESTER-COLL et al., 2006). O STZ foi preparado conforme (HOMOLAK et al., 2021), diluído em tampão citrato 0.05M pH 4.5. Foi injetado um total de 3 mg/kg de STZ nos ventrículos dos animais, quantidade que foi dividida em 2 injeções (1,5 mg/kg cada). A primeira injeção de STZ foi realizada após um período de 3 a 5 dias para recuperação da cirurgia, e a segunda ocorreu 48 h após a primeira. No dia seguinte após a segunda injeção de STZ ou veículo, foi iniciado o tratamento com etanol 3% dos grupos álcool, com duração de 4 semanas. O aprendizado e memória espacial desses animais foram avaliados por meio do Labirinto Aquático de

Morris (LAM), que teve início no primeiro dia após o fim do tratamento e com uma duração de 5 dias.

Após a execução do LAM, os animais foram eutanasiados e seus cérebros foram dissecados e armazenados para o preparo dos homogenatos de proteínas, a serem utilizados para o ensaio de *Western blotting* (ver 3.6).

3.3 Infusão de drogas

A fim de induzir um modelo de DAe com alterações na regulação da via de sinalização de insulina, 13 animais machos da linhagem *Sprague-Dawley* (270-320 g) receberam duas injeções intracerebroventriculares de STZ, com um intervalo de 48 h entre elas (1,5 mg/kg diluídos em 4 µl em cada injeção, totalizando 3 mg/kg em 8 µl).

Os animais foram previamente submetidos à cirurgia extereotáxica com implantação de cânulas para as subsequentes injeções. Para tais procedimentos, os animais foram anestesiados com *Thiopentax* – tiopental sódico 4% (30 mg/kg; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil) e doses de combinação dos anestésicos Ketamina 3% (0,6 mg/kg Agener União Saúde Animal – Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilazina 0,02% (0,4 mg/kg Bayer Saúde Animal – São Paulo, SP, Brasil). O anestésico local subcutâneo de cloridrato de lidocaína 2% contendo epinefrina na combinação de 1:100.000 (*Astra - Naucalpan*, México) foi injetado na pele do dorso do crânio de todos os animais. A fim de prevenir infecções, também receberam dose única de pentabiótico veterinário intramuscular (*Fort Dodge* Saúde Animal LTDA – São Paulo, SP, Brasil).

Após a verificação da anestesia com a não responsividade a estímulos dolorosos, os animais tiveram a pele do dorso do crânio tricotomizada. Em seguida, foram presos por barras auriculares no aparelho estereotáxico (*David Kopf 962* – Tujunga, CA, USA) para assegurar sua imobilização durante a cirurgia. Então, as cânulas foram posicionadas nos

ventrículos laterais (coordenadas estereotáxicas: AP= -0,8 mm; ML= 1,7 mm; DV= 3,4 mm). Na região de contato entre o osso e a cânula foi aplicado acrílico dental (*S.S. White* – Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Ao do período de recuperação da cirurgia foi realizada a primeira injeção de STZ e a segunda 48 h após a primeira.

3.4 Ingestão de Etanol

A fim de mimetizar o consumo alcoólico baixo como um hábito de vida, os animais receberam uma diluição de Etanol (*Álcool Etílico ABS.PA 99,8%*, Êxodo Científica) na água disponível ao grupo álcool *ad libitum* (ao grupo água não foi adicionada essa solução). A concentração escolhida foi de 3% (v/v), como descrito no estudo de Furuya e colaboradores (2003), no qual os valores de sensibilidade insulínica periférica mostraram-se mais elevados após um tratamento de 4 semanas.

Durante o tratamento, o consumo líquido dos animais foi avaliado. As garrafas em que a água ou a solução de etanol ficaram diariamente disponíveis aos animais tiveram seu peso registrado durante o período de tratamento, de forma que, quando eram preenchidas, seu peso (em gramas) era obtido. Na próxima manutenção dos animais, o peso era novamente obtido e subtraído do valor anterior. Assim, o valor do peso (g) foi avaliado em volume (ml), considerando a densidade da água (1g/ml).

3.5 Teste para verificação da memória espacial

A memória dos animais foi testada por meio do Labirinto Aquático de Morris (LAM), em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Sebastião de Souza Almeida, do departamento de Psicobiologia da FFCLRP. Esse é um teste de verificação de aprendizado e memória espacial, no qual o rato deve nadar para encontrar uma plataforma escondida na piscina de nado (MORRIS, 1984). O intuito do teste é que o animal aprenda

a localização da plataforma e o caminho mais rápido até ela, a fim de escapar do ambiente aquático (Fig. 4).

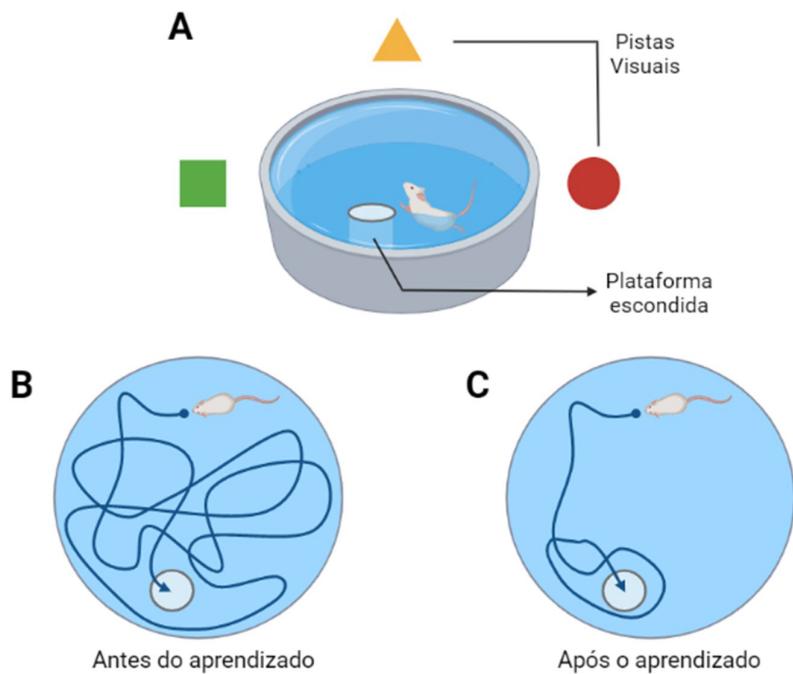


Figura 4. Esquema mostrando o funcionamento do LAM. **A** Os animais são colocados na piscina que contém uma plataforma escondida e não perceptível visualmente; pistas visuais para guiar o aprendizado estão localizadas nas paredes do aparato. **B** Exemplo de rota comumente percorrida pelos animais nas primeiras tentativas do teste, em que ainda não memorizaram a localização da plataforma. **C** Exemplo de rota percorrida após o aprendizado, em que os animais já realizam o caminho mais rápido até a plataforma. Feito em biorender.com.

A piscina de nado possui um diâmetro de 1,5 m e profundidade 39 cm, sendo revestida pela cor preta. A plataforma, também revestida de cor preta, possui um diâmetro de 12 cm e altura de 25 cm, ficando 2 cm abaixo do nível da água. Para a realização do teste, a piscina é dividida em quatro quadrantes imaginários (Q1, Q2, Q3, Q4), nos quais são colocados três pontos de largada (*Freezone 2*, *Freezone 3* e *Freezone 4*). A plataforma é posicionada no centro do quadrante Q1 e as largadas são feitas dos demais quadrantes (Fig. 5).

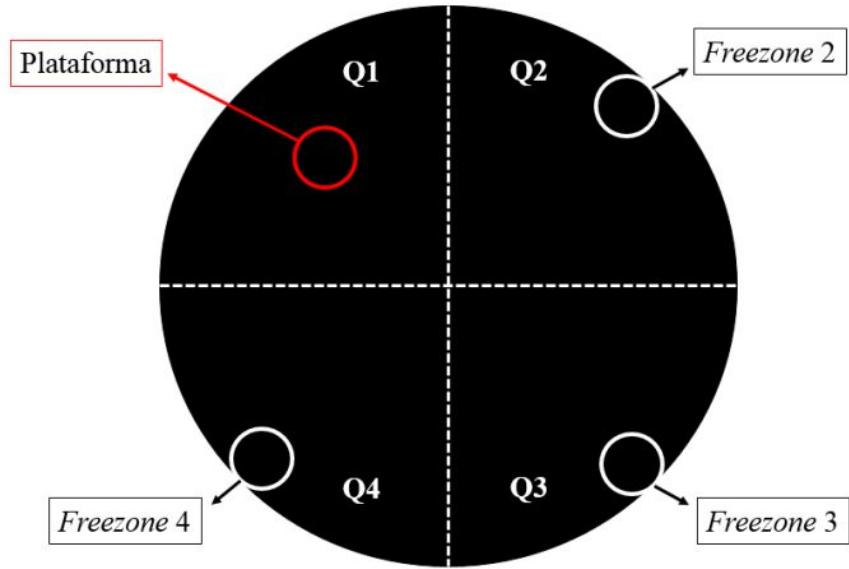


Figura 5. Modelo esquemático do LAM que mostra a divisão do aparato nos quadrantes Q1, Q2, Q3 e Q4, os pontos de largada *Freezone 2*, *Freezone 3* e *Freezone 4*, e a localização da plataforma. Adaptado de: (SANTOS ALVES, 2018).

O teste consiste em 4 dias de treino, cada um com 6 tentativas sequenciais por animal. Duas tentativas adicionais são feitas no quarto dia, a *Probe trial* e o primeiro reteste, avaliando memória de curto prazo. No quinto dia, é feito o segundo reteste para avaliar a memória de longo prazo (24 h), totalizando 27 tentativas que seguem a mesma sequência padrão para largada. Em cada tentativa, os animais são colocados em um ponto de largada diferente do último, com exceção da *Probe trial* e retestes, nos quais os animais sempre partem da *Freezone 3*.

Durante as tentativas, os animais têm um tempo máximo de 60 segundos (s) para encontrar a plataforma de fuga, utilizando apenas pistas visuais localizadas nas paredes da sala do aparato. Para os retestes, entretanto, o tempo máximo é de 180 s. O teste é encerrado quando o animal encontra a plataforma e permanece sobre ela por 30 s, ou quando o tempo máximo é atingido, não encontrando a mesma. Nesse caso, o animal é manualmente colocado sobre a plataforma, também permanecendo por 30 s, e então retirado da piscina. Durante os dias de treino, os animais são recolocados imediatamente

na piscina até completarem as 6 tentativas. Entretanto, na 25^a tentativa (*Probe trial*), realizada no quarto dia, a plataforma é removida e é avaliada a exploração do quadrante alvo (Q1) pelos animais. O primeiro reteste acontece imediatamente após a *Probe trial*, no qual a plataforma é reinserida no centro do quadrante Q1 e os animais possuem apenas uma tentativa para encontrá-la, buscando assim verificar o aprendizado e memorização de curto prazo. O segundo reteste (27^a tentativa) é realizado no dia seguinte (24 h após a última tentativa), a fim de avaliar o aprendizado e memória de longo prazo (ANISMAN; MCINTYRE, 2002; LAMBERTY; KLITGAARD, 2000; MACIEJAK et al., 2006; MORRIS, 1989; SHERAFAT et al., 2013).

Por meio do *software Automatic Tracer Ethovision (Noldus)*, são avaliados os parâmetros: latência (tempo) para localizar a plataforma de escape, velocidade média de natação e ocupação do quadrante alvo Q1.

3.6 *Western Blotting*

3.6.1 Preparo do homogenato cerebral de rato

Após a finalização do LAM, os animais foram transportados de volta ao Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP e passaram por um período de 2 dias de habituação. Em seguida, os ratos foram então eutanasiados por inalação com isoflurano (*BioChimico*) e decapitados. Seus cérebros foram dissecados e os hipocampos foram armazenados em *freezer* a -80° C (em microtubo de 2 mL). Para cada amostra, foram acrescentados 300 µL de tampão RIPA, composto por 50 mM Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂, 1,5 mM EDTA, 1%. Em seguida, as amostras foram sonicadas e o homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos (min) a 4°C (Centrifuga 5810R *Eppendorf*). O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL e congelados a -

20° C até o momento do uso. As proteínas totais foram dosadas utilizando método de *Bradford* (BRADFORD, 1976).

3.6.2 SDS-PAGE e transferência

A partir das soluções estoque [30% bis Acrilamida, Tris HCl 10x pH 6,8 (para gel de empilhamento) ou pH 8,8 (gel de separação), 10% SDS, 10% persulfato de amônio e *TEMED*], os géis de poliacrilamida foram preparados, com 1 mm de espessura e na concentração de 12%. O homogenato foi diluído em tampão de amostra desnaturante (0,313 M Tris HCl pH 6,8, 10% SDS, 10 % sacarose ou glicerol e uma pequena quantidade de azul de bromofenol) 5x concentrado. De cada amostra foram pipetados 30 µg de proteína total (10 µL de volume final) nos poços dos géis já polimerizados. Posteriormente, foi feita a corrida eletroforética em tampão de corrida (25 mM Tris base, 190 mM glicina e 0,1% SDS) e em cuba de eletroforese vertical (*Mini-PROTEAN®, Bio-Rad*) com voltagem constante de 90 volts. As proteínas foram transferidas usando *transblot TURBO* por 40 min para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*), utilizando-se o tampão de transferência (Tris 48 mM; glicina 39 mM; 20% metanol e SDS 0,1%).

3.6.3 Bloqueio, incubação com anticorpos e revelação

Após a transferência, a membrana foi incubada, sob agitação constante, em solução de bloqueio 5% de leite desnatado diluído em solução TBS-T 1x (TBS suplementado com 0,05% de *Tween 20, Sigma-Aldrich®*). Após 1 h de incubação, a membrana foi lavada uma vez com TBS-T 1x sob agitação, e novamente incubada em solução de anticorpos primários 2,5% BSA/TBS-T (as concentrações especificadas pelos fabricantes foram utilizadas), sob agitação a 4°C *overnight* (12-16 h) ou por 1 h em temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo de coelho *anti-Pan-Akt* (*A18675*), anticorpo de coelho *anti-Fosfo-Akt1-S473* (*AP0140*) e anticorpo de camundongo *anti-*

Actin (MAB1501). Posteriormente, a membrana foi lavada 3x com *TBS-T* por 10 min cada e incubada com solução do anticorpo secundário conjugado com *HRP* diluída em solução 2,5% *BSA/TBS-T*, sob agitação por 1 h a temperatura ambiente.

Após o tempo indicado, a membrana foi novamente lavada. A revelação dos reagentes foi feita com o *kit ECL SelectTM Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences)*. O sinal de quimioluminescência foi captado através do aparelho fotodocumentador *ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad)*. As bandas foram quantificadas pelo *software ImageJ/Fiji*.

3.7 Análise estatística

Para análise das estratégias de navegação no LAM, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Tukey* para comparações múltiplas. Os dados de *Western Blot* também foram quantificados pela análise de variância (ANOVA). Os valores de p iguais ou inferiores a 5% ($p < 0,005$) foram considerados significativos. Toda a análise estatística foi realizada através do software estatístico *GraphPad Prism 8*.

4. RESULTADOS

4.1 Consumo Líquido

A fim de mensurar a quantidade de álcool ingerida por cada grupo experimental, realizamos pesagens das garrafas em que a água ou a solução de etanol era oferecida durante o período de tratamento. As pesagens foram feitas a cada manutenção dos animais no biotério. Comparações foram feitas para a variável “modelo”, para se referir aos grupos experimentais “Controle”, WAR” e “icv-STZ”; e para a variável “tratamento”, para se referir aos animais que receberam álcool ou água durante o período de 4 semanas, durante o qual visamos mimetizar um consumo crônico e baixo de álcool como um hábito de vida. Para a análise estatística, foi realizada uma ANOVA de duas vias e o teste *post hoc* de *Tukey*.

Os resultados obtidos mostraram efeito significativo da variável modelo ($p=0,0002$) sobre o consumo líquido dos animais. Os animais WAR consumiram menos água ($p=0,0018$) e álcool ($p=0,0049$) que os animais controles dos respectivos grupos. Em relação aos animais icv-STZ, os animais WAR também consumiram menos água ($p= 0,0239$) e menos álcool ($p= 0,0262$) (Fig. 6).

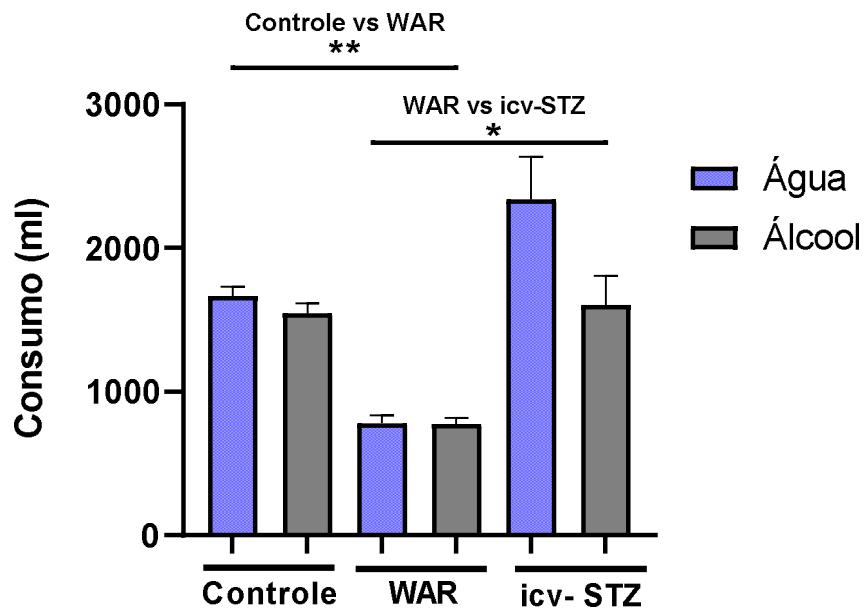


Figura 6. Representação do consumo médio de água e álcool dos animais Controle, WAR e icv-STZ durante as 4 semanas de tratamento. Os dados são expressos como as médias \pm SEM. A análise estatística foi calculada por uma análise de variância de medidas repetidas de duas vias (ANOVA) e teste de *Tukey*. Os asteriscos indicam diferenças significativas como segue: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

4.2 Avaliação da memória espacial

Foi avaliada a performance na navegação espacial dos animais no LAM durante as 24 tentativas de aquisição espacial (dias de treinamento) e testes, executados imediatamente (Teste 1) e 24 h (Teste 2) após a *probe trial*. O Teste 1 permite avaliar a memória de curto prazo dos animais, enquanto o Teste 2, a memória de longo prazo. Os parâmetros analisados foram: latência de escape e velocidade de natação durante os dias de treinamento, *probe* e testes. Os dados foram obtidos usando o programa *EthoVision* (*Noldus*) e aplicamos a análise de variância ANOVA de três vias (dias de treinamento e testes 1 e 2) ou duas vias (*probe*), seguido pelo teste *post hoc* de *Tukey*.

4.2.1 Latência

Ao longo dos dias de treinamento, observou-se um efeito da variável “dia de treinamento” sobre o parâmetro latência (em segundos) para encontrar a plataforma de escape (Fig 7A). Os animais do grupo Controle tiveram menor latência no último dia de treinamento em relação ao primeiro, tanto os animais do grupo água ($p=0,0002$) quanto do grupo álcool ($p=0,0021$). Os animais WAR também tiveram menor latência no último dia de treinamento em relação ao primeiro, tanto os animais do grupo água ($p=0,0033$) quanto do grupo álcool ($p=0,0386$). Esse achado sugere que esses animais aprenderam a tarefa ao longo dos 4 dias de aquisição espacial. Os animais icv-STZ, por outro lado, não apresentaram diferença significativa na latência do primeiro dia de treinamento em comparação com o último, tanto para os animais tratados com álcool ($p=0,6580$), quanto

para os que receberam apenas água ($p=0,9236$). Esses dados indicam que os animais icv-STZ não aprenderam a tarefa proposta de encontrar a plataforma de escape.

Observamos, também, um efeito da variável “modelo” sobre a latência de escape nos dias de treinamento, indicando que os animais WAR, para ambos os grupos que receberam álcool ou água, apresentaram uma maior latência para encontrar a plataforma quando comparados aos animais Controle ($p<0.0001$) (Fig 7A). Da mesma forma, os animais icv-STZ, de ambos os grupos que receberam álcool ou água, também levaram mais tempo para encontrar a plataforma quando comparados aos animais Controle ($p<0.001$) (Fig 7B). Já entre os modelos WAR e icv-STZ, não houve diferença significativa para a latência de escape durante os dias de treinamento (Fig 7C). Para a variável “tratamento”, não se observou efeito sobre o parâmetro latência. Esses achados sugerem que tanto os animais injetados com STZ quanto os animais da linhagem WAR apresentam pior performance no LAM durante o período de treinamento. Entretanto, a administração de álcool (3%) não foi capaz de atenuar essas alterações.

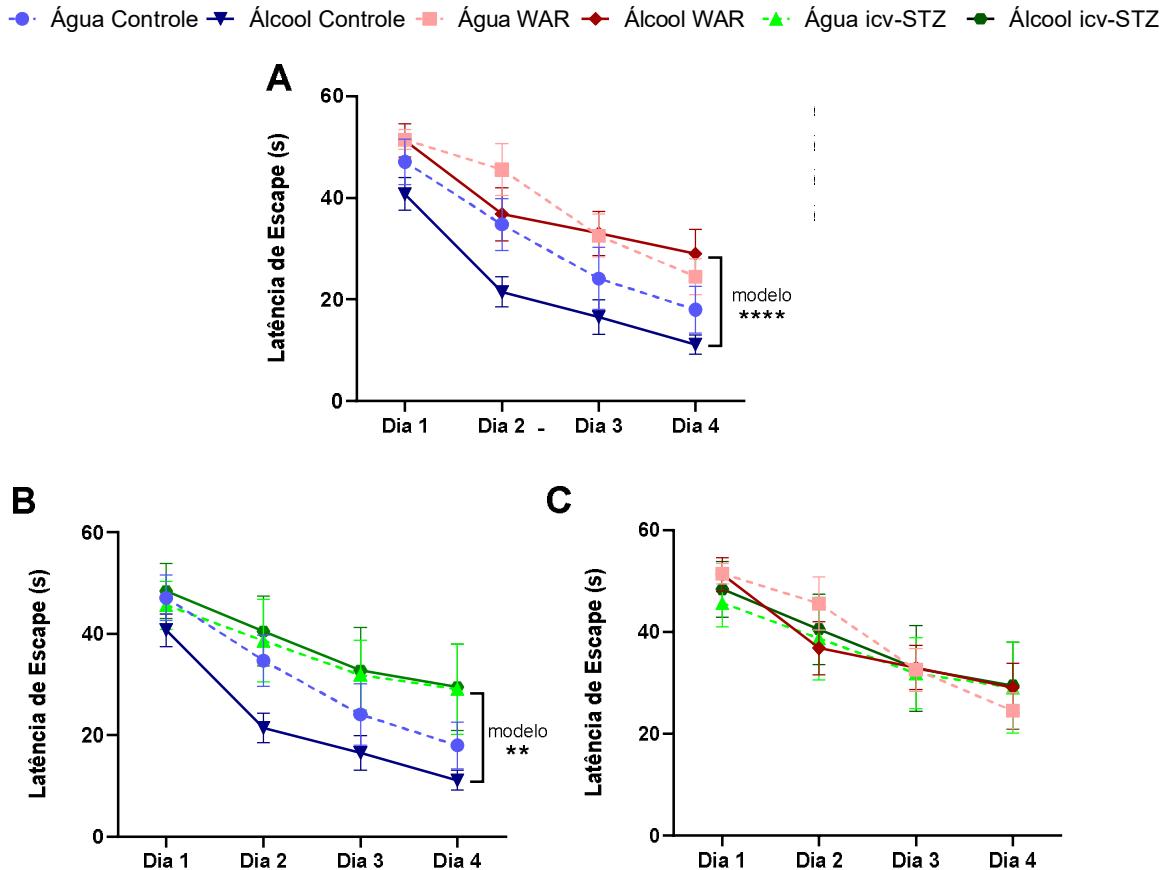


Figura 7. Latência para localizar a plataforma de fuga durante a aquisição espacial ao longo dos dias. **A** Gráfico que mostra apenas os dados de latência dos grupos Controle e WAR, para melhor visualização. **B** Gráfico com apenas os dados dos grupos Controle e icv-STZ. **C** Gráfico com apenas os dados dos grupos WAR e icv-STZ. A análise estatística foi calculada por uma análise de variância de medidas repetidas de três vias (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey. Os asteriscos indicam diferenças significativas como segue: **p < 0,01; ***p < 0,0001.

Durante a *probe trial*, que ocorre imediatamente após a 24^a tentativa de treinamento, a plataforma de escape é retirada e os animais nadam livremente por 1 min. O tempo de ocupação do quadrante alvo Q1 (onde estava localizada a plataforma) é obtido, o que permite avaliar o processo de recuperação de memória espacial dos animais. Observamos, para a *probe*, um efeito da variável “modelo” sobre o tempo de ocupação do quadrante alvo ($p=0.0239$). Entretanto, o teste *post hoc* Tukey utilizado não foi capaz de identificar em quais comparações específicas se encontra essa diferença apontada pela análise de

variância. As médias (em segundos) encontradas para essa análise foram: Controle água ($22,02 \pm 3,54$ s), Controle álcool ($31,52 \pm 2,41$ s), WAR água ($16,88 \pm 2,11$ s), WAR álcool ($15,49 \pm 2,68$ s), icv-STZ água ($21,02 \pm 5,35$ s), icv-STZ álcool ($19,68 \pm 4,24$ s) (Fig. 7).

Além disso, não identificamos um efeito da variável tratamento para o parâmetro “tempo de ocupação do quadrante alvo” durante a *probe trial* ($p=0,5039$) (Fig. 8). Esses dados sugerem que os modelos murinos utilizados exploram diferencialmente o quadrante alvo, apesar de não termos identificado em quais grupos se encontra essa diferença.

Probe Trial

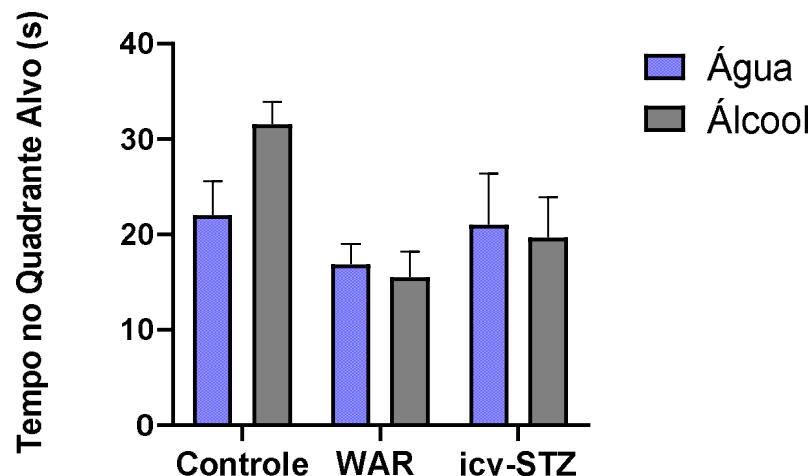


Figura 8. Tempo de ocupação do quadrante alvo durante a *probe trial*, com diferenças entre *modelos. ANOVA duas vias, *post hoc* Tukey. * $p<0,05$.

Imediatamente após a *probe trial*, a plataforma é realocada no quadrante alvo Q1 e é realizado o primeiro teste, em que a retenção de memória de curto prazo é avaliada. Um segundo teste é realizado 24 h após o primeiro, a fim de avaliar a memória a longo prazo. Para os testes, observamos um efeito da variável “modelo” sobre a latência para encontrar a plataforma de escape. Os animais WAR ($p=0,0306$), assim como os animais icv-STZ ($p=0,0271$), apresentaram uma maior latência de escape em relação aos animais Controle em ambos os testes (Fig 9A, B). Não foi observado efeito da variável “dia” sobre a

latênciam, o que indica que não há diferença significativa na performance dos animais entre os testes de curto e longo prazo. Não encontramos diferença na latênciam entre os modelos WAR e icv-STZ (Fig. 9C). Também não foi observado efeito da variável “tratamento” sobre o parâmetro latênciam nos testes (Fig. 9). Esses dados sugerem que os animais WAR e icv-STZ possuem um pior desempenho nos testes de memória de curto e longo prazo em relação aos animais Controle, e o tratamento com álcool 3% não foi capaz de influenciar o desempenho em nenhum dos modelos experimentais.

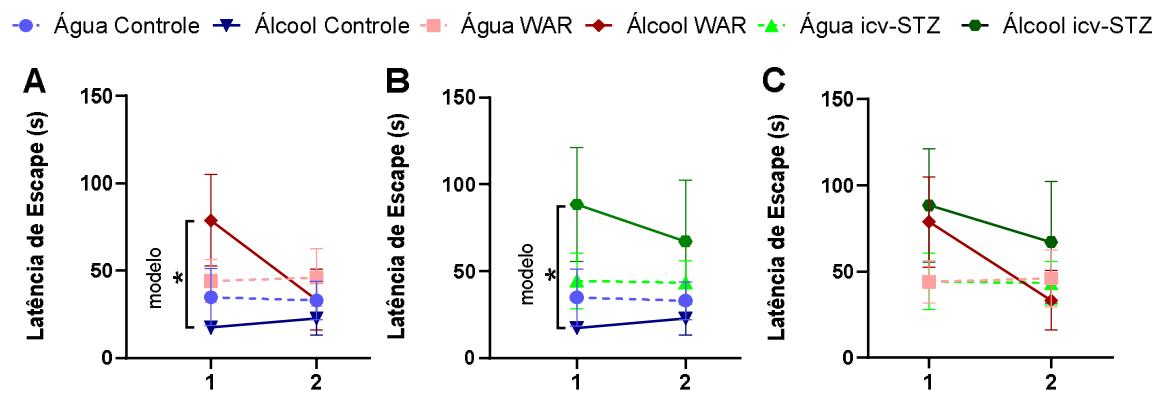


Figura 9. Latênciam para localizar a plataforma de escape durante os testes 1 (imediatamente após a *probe trial*) e 2 (24 h após a *probe trial*). **A** Gráfico mostrando apenas os dados de latênciam dos grupos Controle e WAR, para melhor visualização. **B** Gráfico com apenas os dados dos grupos Controle e icv-STZ. **C** Gráfico com apenas os dados dos grupos WAR e icv-STZ. A análise estatística foi calculada por uma análise de variânciam de medidas repetidas de três vias (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey. O asterisco indica diferença significativa como segue: * $p < 0,05$.

4.2.2 Velocidade

Durante o período de treinamento, observamos um efeito da variável “dia de treinamento” sobre a velocidade de natação dos animais ($p=0.0001$) (Fig. 10), indicando que a velocidade de natação variou durante as tentativas do LAM. Entretanto, não foi observado efeito da variável “modelo” sobre a velocidade, ou seja, a velocidade de natação entre os animais dos grupos Controle, WAR e icv-STZ foram similares durante

o período de treinamento (Fig. 10A, B, C). Já em relação à variável “tratamento”, observamos que apenas os animais do grupo icv-STZ tratados com álcool apresentaram uma maior velocidade de natação em relação aos animais do mesmo grupo que receberam apenas água ($p<0,0001$) (Fig. 10B, C). Não encontramos diferenças significativas para a velocidade dos animais durante a *probe trial* (Fig. 11) ou durante os testes de curto e longo prazo. Esses dados sugerem que o tratamento com álcool 3% pode influenciar na velocidade de navegação espacial dos animais icv-STZ durante os dias de treinamento, mas não durante a *probe* e testes.

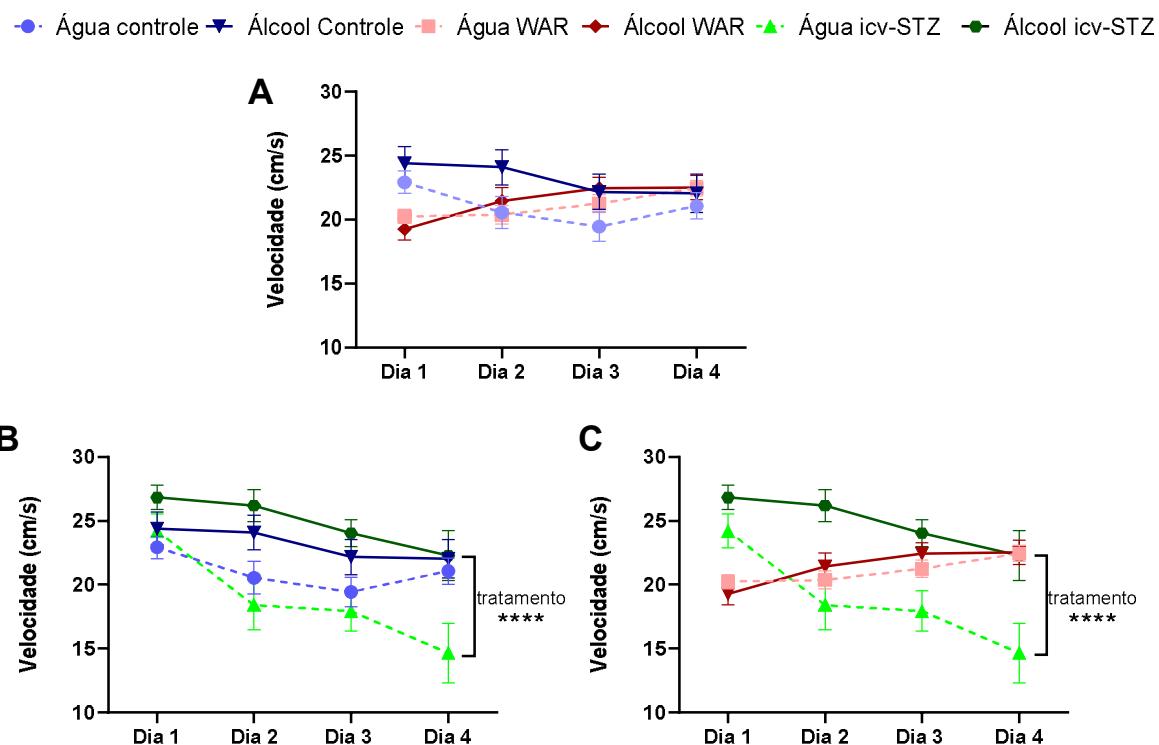


Figura 10. Velocidade de natação durante a aquisição espacial representada por dia. **A** Gráfico que mostra apenas os dados de velocidade dos grupos Controle e WAR, para melhor visualização. **B** Gráfico com apenas os dados dos grupos Controle e icv-STZ. **C** Gráfico com apenas os dados dos grupos WAR e icv-STZ. A análise estatística foi calculada por uma análise de variância de medidas repetidas de três vias (ANOVA) e teste de Tukey. Os asteriscos indicam diferenças significativas como segue: ***p < 0,0001.

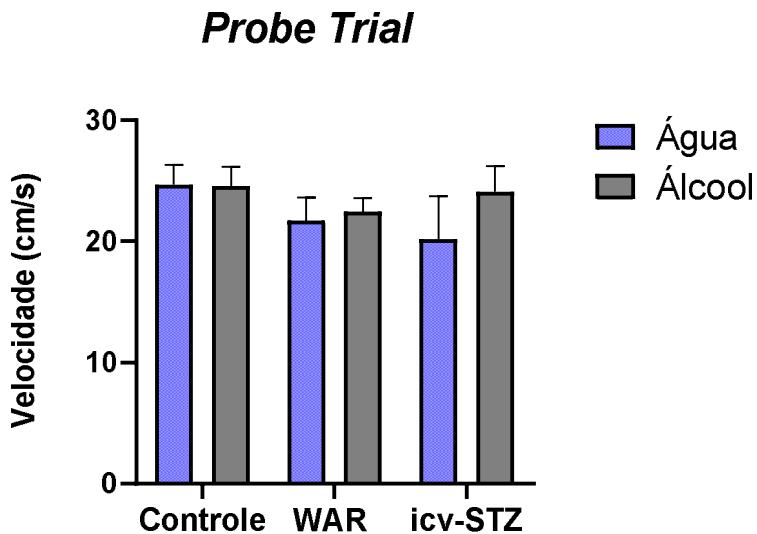


Figura 11. Velocidade de natação durante a *probe trial*. ANOVA duas vias, *post hoc Tukey*.

4.3 Análise da fosforilação da *Akt* hipocampal

A fim de avaliar os efeitos do tratamento com álcool sobre a sinalização cerebral insulínica, realizamos o ensaio de WB para quantificação da proteína *Akt*, cuja atividade tem papel importante na regulação dos principais marcadores da DA (GHASEMI et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2010; HONG; LEE, 1997). Para determinar os níveis de ativação dessa proteína nos hipocampos dos animais, quantificamos a fosforilação de *Akt* em serina 473, a qual já foi reportada em quantidades reduzidas na DA (MOLONEY et al., 2010).

Identificamos um efeito significativo da variável “modelo” sobre os níveis basais de *pAkt* no hipocampo de animais WAR ($p=0,0296$) (Fig. 12A). Mais especificamente, observamos um aumento dos níveis de *pAkt* nos animais WAR que receberam apenas água quando comparados aos seus controles ($p=0,0383$) (Fig. 12B). Para os níveis de *tAkt*, não identificamos diferença significativa para as variáveis “modelo” ($p=0,1055$) ou “tratamento” ($p=0,1954$) (Fig. 12C). Quando comparamos a razão *pAkt/tAkt* de animais

tratados com álcool com os que receberam apenas água, também não encontramos efeito das variáveis tratamento ($p=0,0933$), ou modelo ($p=0,2340$), embora as médias representadas no gráfico sugiram um aumento dessa razão em animais icv-STZ tratados com álcool (Fig. 12D)

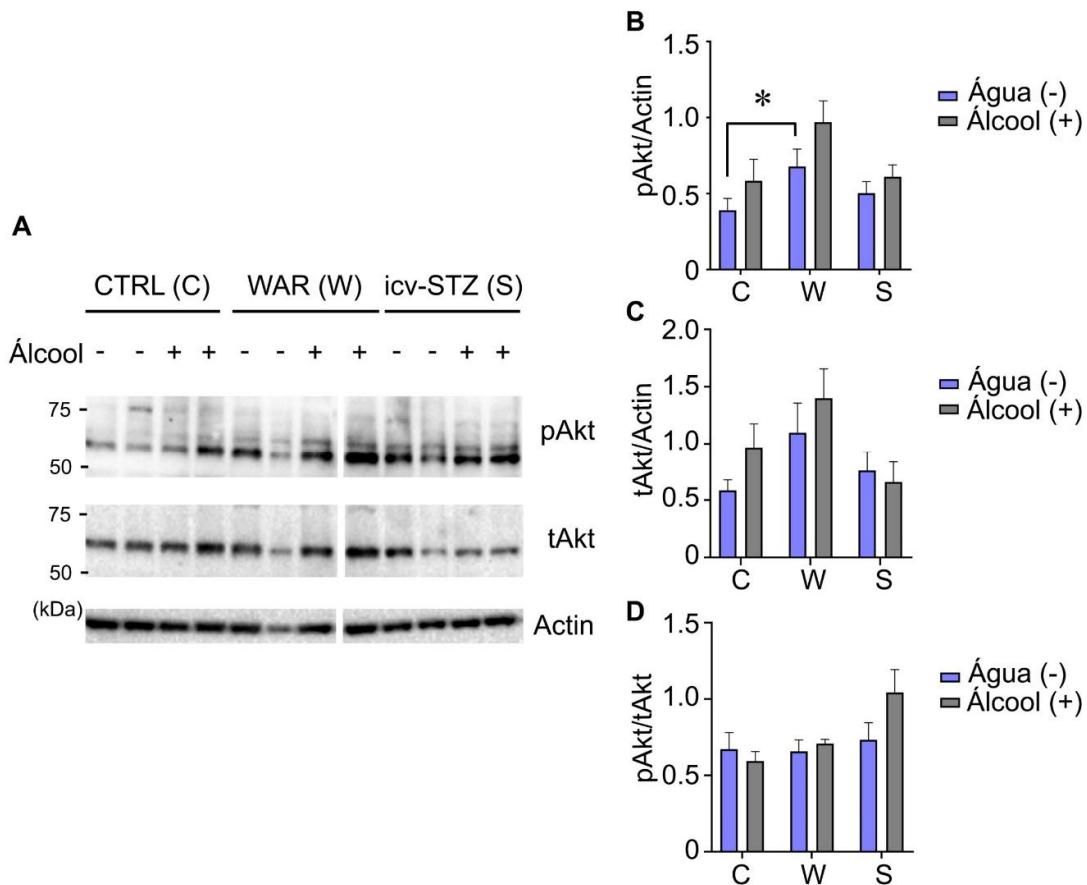


Figura 12. Análise de WB de *Akt* fosforilada (*pAkt*) e total (*tAkt*) no hipocampo dos animais Controle (C), WAR (W) e icv-STZ (S), tratados com água (-) ou álcool (+). A Membrana representativa dos grupos CTRL, WAR e icv-STZ tratados (+) ou não (-) com álcool e marcada para *pAkt* (S473), *tAkt* e actina. **B** Quantificação de *pAkt* normalizada com os níveis de actina. **C** Quantificação de *tAkt* normalizada com os níveis de actina. **D** Quantificação da relação *pAkt-tAkt*. Os dados são expressos como média \pm SEM. $n= 4$ animais por grupo. A análise estatística foi calculada pela análise de variância ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Tukey. O asterisco indica diferença significativa como segue: * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscamos identificar efeitos do consumo baixo de álcool no processo de aprendizado e memória e na ativação da via de sinalização da insulina em animais cognitivamente saudáveis e em dois modelos utilizados para o estudo de DAe, WAR e icv-STZ. Os resultados apresentados indicam um pior desempenho de animais icv-STZ e WARs em relação aos animais do grupo Controle no LAM. Entretanto, não observamos diferença significativa entre animais tratados com água ou com álcool. Análises de WB mostraram maiores níveis basais da proteína *Akt* fosforilada no hipocampo dos animais WAR, mas nenhum efeito significativo sobre a ativação dessa proteína foi encontrado após a administração de etanol.

No LAM, animais cognitivamente saudáveis tendem a aprender a tarefa de encontrar a plataforma de fuga ao longo do período de treinamento, utilizando o menor tempo possível para tal (latência) (MORRIS, 1984). No presente trabalho, os dados indicaram que os animais Controle e WAR aprenderam a tarefa proposta de localizar a plataforma durante os 4 dias de treinamento, independente do tratamento ou não com álcool. Entretanto, animais WAR de ambos os grupos (tratados ou não com álcool) apresentam pior performance no teste quando comparados aos seus controles. Já os animais icv-STZ não aprenderam a tarefa proposta, indicando um prejuízo nos processos de aprendizado e memória. Esses dados estão em concordância com estudos anteriores, que também mostraram diminuição da latência de escape dos animais WAR ao longo dos dias de treinamento (ALVES et al., 2022), e uma incapacidade dos animais icv-STZ de aprender a tarefa proposta no LAM (LI et al., 2016).

Ainda assim, embora os animais WAR aprendam a tarefa de localizar a plataforma de fuga, eles apresentam um pior desempenho no LAM, da mesma forma que os animais icv-STZ, quando comparados aos animais do grupo Controle. Outros estudos também já mostraram que os modelos WAR e icv-STZ apresentam comprometimento de memória

espacial (ALVES et al., 2022; CHEN et al., 2013; CUNHA et al., 2015; EL SAYED; GHONEUM, 2020; KAMAT, 2015; KAZKAYASI et al., 2022; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2011). Além disso, durante a *probe trial*, tentativa em que a plataforma é removida, podemos avaliar a precisão da navegação espacial do animal pelo tempo que permanece à procura da plataforma no quadrante alvo. No presente estudo, o efeito da variável “modelo” identificado pela análise de variância no tempo de ocupação do quadrante alvo durante a *probe* é sugestiva de uma menor exploração desse quadrante pelos modelos WAR e icv-STZ, em comparação ao grupo Controle, considerando o gráfico e as médias dos valores de cada grupo. Esses dados sugerem, novamente, uma deficiência na retenção de memória e na navegação espacial desses animais. Entretanto, também não foram observados efeitos do tratamento na performance dos animais nessa tentativa, o que indica que o tratamento com álcool 3% não foi capaz de melhorar ou piorar o desempenho de animais cognitivamente saudáveis ou dos modelos com comprometimento de memória LAM.

Além disso, identificamos diferenças na velocidade de natação dos animais durante a aquisição espacial nos dias de treinamento no LAM. A velocidade também é um parâmetro importante para a representação do desempenho cognitivo dos animais no LAM, visto que diferenças na velocidade de natação podem indicar deficiências na atividade locomotora (LINDNER, 1997; VORHEES; WILLIAMS, 2006). Nesse estudo, observamos um efeito do tratamento com álcool apenas sobre a velocidade de natação de animais icv-STZ. Essa alteração pode ser interpretada como um efeito do etanol sobre a atividade locomotora desse modelo; entretanto, para que isso seja confirmado, esses animais teriam que ser submetidos a testes comportamentais que avaliam especificamente esse tipo de performance.

Nesse sentido, Boerngen-Lacerda e colaboradores (2000) identificaram que a administração crônica de uma baixa dose de etanol (2 g/kg) aumentou a atividade locomotora de camundongos nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Além disso, o tratamento também apresentou um efeito ansiolítico, com aumento da atividade exploratória dos animais nesses testes comportamentais (BOERNGEN-LACERDA; LUCIA; SOUZA-FORMIGONI, 2000). Outros estudos também já relataram um aumento de atividade motora e exploratória por baixas doses de álcool (CORREA; MIQUEL; ARAGON, 2000; POHORECKY, 1977; WALLER et al., 1986). Dessa forma, no presente estudo, esse efeito pode ser modelo-dependente, visto que foi observado apenas nos animais icv-STZ. De fato, já foi reportado que animais icv-STZ demonstraram sintomas de comportamento hiperativo e impulsivo, que duraram apenas da segunda à quarta semana após a injeção de STZ (BLOCH et al., 2017), bem como hiperatividade motora (ANGELOVA et al., 2018). Tal comportamento previamente identificado pode, portanto, ter sido potencializado pela administração de etanol nos animais icv-STZ.

Por outro lado, durante a *probe trial*, não identificamos diferenças entre a velocidade de natação de animais tratados ou não com álcool para nenhum dos modelos experimentais, incluindo os animais icv-STZ. Dessa forma, as alterações de velocidade apresentadas pelos animais icv-STZ tratados com álcool durante as tentativas de treinamento não se reproduziram durante a *probe*, o que sugere que essas alterações estão, na verdade, relacionadas às estratégias de navegação para execução da tarefa e não a comprometimento locomotor. Para confirmação desses dados, outros testes comportamentais específicos devem ser realizados, como o teste de campo aberto, o teste na roda de corrida (*wheel running*) ou o teste de desempenho motor no *rotarod* (utilizado para avaliar coordenação motora e detectar disfunção cerebelar).

Embora haja farta documentação em humanos dos efeitos do baixo consumo de álcool sobre a cognição (BRENNAN et al., 2020; KUHNS et al., 2022; WANG et al., 2021), poucas evidências experimentais, até o momento, descrevem os efeitos do consumo crônico e baixo de etanol sobre o desempenho cognitivo e, mais especificamente, sobre os processos de consolidação de memória espacial. Nossos dados mostram que os animais tratados com álcool não diferem de animais que receberam apenas água nos processos de aprendizagem e retenção de memória no LAM, evidenciado pelo parâmetro latência. De forma semelhante, estudos experimentais já mostraram que doses baixas de etanol não são capazes de prejudicar o processo de aprendizado e memória (ACHESON; ROSS; SWARTZWELDER, 2001; ALKANA; PARKER, 1979; CULLEN et al., 2014; MARKWIESE et al., 1998). Embora não tenhamos encontrado uma melhora no desempenho dos animais que receberam álcool no LAM, Acheson e colaboradores (2001) já reportaram uma facilitação da memória no LAM por administração de baixas doses de etanol. Por outro lado, estudos também já mostraram um efeito dose-dependente do etanol sobre a memória espacial, de forma que apenas concentrações muito baixas não afetaram o desempenho dos animais (GIVENS, 1995; MATTHEWS et al., 2002; MELCHIOR; GLASKY; RITZMANN, 1993; WHITE M.; SIMSON E.; J. BEST, 1997). Mathews e colaboradores (2002), por exemplo, identificaram que uma dose aguda de 1g/kg intraperitoneal (ip) não prejudicou a performance dos animais no LAM, enquanto doses de 1.5 e 2.0 g/kg causaram prejuízos na memória espacial. Assim, no presente estudo, também identificamos que uma administração crônica de etanol em baixas doses não afetou a memória de animais cognitivamente saudáveis e não piorou o desempenho cognitivo de animais que apresentam prejuízos de memória espacial.

A baixa dose escolhida para o trabalho, de 3% de álcool, foi baseada no estudo de Furuya e colaboradores (2003), que mostrou ser a dose com maior resposta de sensibilidade insulínica sistêmica em ratos *Wistar naïve*. Nesse contexto, diversas evidências já mostraram que a insulina é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e agir sobre o sistema nervoso central (BANKS et al., 1997; PARDRIDGE; EISENBERG; YANG, 1985) e suas funções nesse sistema são, portanto, ligadas à sua sinalização periférica. Evidências na literatura mostram que doses acima de 3%, como no estudo de Cacace e colaboradores (2011), que utilizaram uma concentração de 10% etanol, foram relacionadas a um efeito facilitador de formação de memória no LAM por uma exposição crônica a etanol, sugerindo melhor flexibilidade e adaptabilidade a novas tarefas dos animais *Wistar*. Entretanto, uma dose de 8.1%, no estudo de Walker e colaboradores (1980), causou perda neuronal significativa no hipocampo e giro denteados de ratos. Em contraposição ao estudo com efeitos positivos no LAM com 10% de álcool de Cacace e colaboradores, concentrações maiores já foram relacionadas com um pior desempenho de animais em testes de memória (ARENNDT et al., 1989; HODGES et al., 1991; MELIS et al., 1996). Considerando a divergência de protocolos experimentais e resultados heterogêneos (ora positivos, ora negativos) encontrados com concentrações maiores que 3%, entendemos que este grupo de estudos é inconclusivo. No caso específico de nosso protocolo, pelo fato de não observarmos nem prejuízo nem melhora nos processos de consolidação de memória (LAM) dos animais após tratamento com álcool 3%, não temos como concluir sobre se essa dose poderia ter potencial efeito sobre a sinalização insulínica cerebral. Concluímos outrossim, que, álcool 3% não causa prejuízos de memória nos modelos ora estudados: STZ e WAR.

Outro fator que pode ter determinado os resultados aqui encontrados para o tratamento é a duração do mesmo, de 4 semanas, também baseado no trabalho de Furuya

e colaboradores (2003), onde identificaram maior sensibilidade insulínica sistêmica nesse período de tratamento. De fato, existe uma grande variedade na literatura, de períodos de tratamento para uma exposição crônica de etanol, que vão de dias (ELSAED EBADA et al., 2014; FILATOVA et al., 2022; FURUYA; BINSACK; MACHADO, 2003) até meses (FARR et al., 2005; SANTÍN et al., 2000; WANG et al., 2006) de duração, e que geralmente não apresenta resultados concordantes. Os efeitos positivos no LAM identificados por Cacace e colaboradores (2011), por exemplo, foram derivados de um tratamento de 4 semanas com etanol 10%. Já Wang e colaboradores (2006), quando não identificaram efeitos do tratamento com etanol 6% no teste de memória espacial, e a duração do tratamento foi de aproximadamente 7 meses. Dessa forma, identificar a combinação ideal de concentração de álcool versus duração ideal para um tratamento crônico de baixas concentrações de etanol torna-se um desafio.

Nesse contexto, é importante ressaltar a falta de padronização encontrada na literatura para a atribuição de termos às concentrações de etanol utilizadas, tais como “baixas”, “moderadas” ou “altas”. A referência utilizada para o delineamento experimental deste trabalho refere-se à concentração de 3% como “baixa” (FURUYA; BINSACK; MACHADO, 2003). Wang e colaboradores (2006), utilizaram o termo “consumo moderado” para se referir ao tratamento com etanol 6%, assim como Cacace e colaboradores (2011), para referir-se ao tratamento com etanol 10%. Entretanto, o termo “moderado” já foi utilizado, por Justice e colaboradores (2019), para se referir a uma exposição a 20% etanol, enquanto Wolffgramm e colaboradores (1990) se referiram a 20% etanol como uma “alta” concentração. Ainda, apenas o termo “consumo crônico” também é utilizado, geralmente encontrado em estudos que utilizam concentrações maiores que 20% de etanol e que buscam identificar efeitos deletérios do álcool para o tratamento (ARENDT et al., 1989; FILATOVA et al., 2022; HODGES et al., 1991;

HUSAIN et al., 2005; MELIS et al., 1996). Assim, a classificação da quantidade de álcool ingerida torna-se parcialmente subjetivo, não só para estudos experimentais, mas também para o padrão de consumo visto em estudos populacionais, onde termos como “abstinentes”, “consumidores sociais ou ocasionais”, “moderados” e “diários” são encontrados (FREUND; BALLINGER, 1992).

No sentido dos padrões de consumo, uma variável também frequentemente considerada é o tipo de álcool consumido, como os fermentados (cerveja), os destilados ou o vinho. O vinho, especialmente, é comumente relacionado a um efeito benéfico devido à presença de compostos antioxidantes. São esses os polifenóis, como o resveratrol, um componente anti-inflamatório que já foi relacionado a uma redução da patologia de A β na DA (VINGTDEUX et al., 2008). Entretanto, diversos estudos não foram capazes de diferenciar os efeitos do vinho de outros tipos de bebidas alcoólicas (CORDAIN et al., 2000; KIM et al., 2009; LANGE, 2018). Tais achados se dão, principalmente, pelas quantidades muito baixas desses polifenóis presentes no vinho. Rocha-González e colaboradores (2008), por exemplo, relataram que, considerando a média de 0,05 a 25 mg/L de resveratrol em uma garrafa de vinho e a baixa biodisponibilidade desse composto, seriam necessárias aproximadamente 20 taças de vinho tinto por dia para alcançar o potencial terapêutico do resveratrol (LANGE, 2018; RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006; ROCHA-GONZÁLEZ; AMBRIZ-TUTUTI; GRANADOS-SOTO, 2008). Portanto, consideramos os potenciais efeitos positivos do consumo baixo de álcool como atribuídos apenas ao etanol, em concordância com a literatura.

Nesse sentido, diversos estudos que também buscaram avaliar os efeitos do consumo baixo de álcool analisaram se haveria uma preferência pelo consumo da solução de etanol em detrimento da solução com apenas água, o que também poderia influenciar

nos efeitos comportamentais e moleculares observados. No presente trabalho, identificamos que não houve diferenças entre o consumo líquido dos grupos tratados com etanol ou com água para nenhum dos modelos, mostrando que a imposição do etanol não causou alteração na ingestão líquida dos animais. Esses dados estão em concordância com trabalhos na literatura que já mostraram que a ingestão de fluídos não foi alterada pelo tratamento com etanol quando comparado ao controle (água) (ELSAED EBADA et al., 2014; WANG et al., 2006). É importante observar que os estudos citados realizaram o protocolo experimental de forma semelhante ao presente trabalho, com a solução de etanol sendo a única fonte de líquido oferecida aos animais tratados, visto que existem trabalhos de *free-choice* (livre escolha), que avaliam especificamente a preferência ao álcool em relação a outro líquido quando há uma possibilidade de escolha (CACACE et al., 2011; FILATOVA et al., 2022). Sendo assim, a diferença que encontramos foi, na verdade, no consumo líquido, grupos álcool e água inclusos, dos animais WAR em relação aos animais Controle e icv-STZ. Não existem, até o momento, estudos que mostraram um menor consumo líquido da cepa WAR em relação a outras linhagens, embora já tenham sido encontradas alterações metabólicas e endócrinas nessa cepa (BOTION; DORETTO, 2003; GARCIA-CAIRASCO et al., 1994).

A fim de complementar os resultados comportamentais do tratamento com etanol com análises no cenário molecular, buscamos avaliar alterações moleculares relacionadas à sinalização insulínica cerebral nesses animais. Já foi reportado que o baixo consumo de álcool é capaz de diminuir a resistência insulínica sistêmica (NANCHAHAL; ASHTON; WOOD, 2000; RIMM et al., 1991), bem como influenciar positivamente na longevidade associada a DA (HEYMANN et al., 2016). Por isso, buscamos observar os efeitos do álcool na DA considerando a presença de desregulação da sinalização insulínica cerebral em sua fisiopatologia e os efeitos do álcool sobre essa mesma via. Dessa forma,

quantificamos os níveis de *Akt* total e fosforilada em *serina 473*, tendo em vista seu papel importante na via de sinalização *PI3K/Akt/GSK-3* da insulina cerebral, a qual se encontra alterada na DA, como um possível *link* entre os efeitos do álcool sobre a doença e sobre a sensibilidade insulínica, visto que evidências já relacionaram baixas quantidades de etanol a um aumento significativo dos níveis de *Akt* cerebral (HAFEEZ et al., 2014), mas não em modelos de DA.

As análises de WB mostraram níveis similares de *Akt* total para os modelos STZ/WAR e os respectivos tratamentos utilizados no estudo. Já em relação aos níveis de *Akt* fosforilada, identificamos um aumento dos níveis dessa proteína no hipocampo dos animais WAR que receberam apenas água em relação aos animais Controle que também receberam apenas água. Embora esse achado seria sugestivo de um aumento da ativação da *Akt*, que é decorrente de sua fosforilação, é necessário avaliar o nível de ativação da proteína através da razão *pAkt/tAkt*. Não identificamos, para a razão *pAkt/tAkt*, diferenças entre os animais WAR e Controle que receberam apenas água. Nesse contexto, Alves e colaboradores já identificaram um aumento nos níveis de fosforilação de *GSK-3α/β* no hipocampo de animais WAR comparados ao seu controle (*Wistar Hannover*) (ALVES et al., 2022). Tal achado indicaria que a atividade da *Akt* poderia estar aumentada nesses animais, visto que é a enzima responsável pela regulação da atividade da *GSK-3* por fosforilação. No presente estudo, apesar de não termos observado diferenças para a razão *pAkt/tAkt* entre os animais Controle e WAR, os maiores níveis de *Akt* fosforilada identificados nos animais WAR sugerem uma potencial atividade aumentada da proteína nesse modelo, embora seja necessário um maior “n” amostral do que o utilizado nas presentes análises quantitativas (4 animais por grupo) para demonstrar esse dado com relevância estatística, uma vez que o gráfico mostra apenas uma eventual tendência a atividade de *Akt* aumentada nos animais WAR em relação ao grupo Controle.

Nesse sentido, também não identificamos um aumento significativo da razão *pAkt/tAkt* nos animais *icv-STZ*, baseado nas análises realizadas com um n de 4 animais por grupo. Nesse contexto, Furuya e colaboradores (2005) demonstraram que um consumo baixo de etanol é capaz de aumentar a fosforilação de *Akt* sistêmica. Hafeez e colaboradores (2014), por sua vez, já identificaram um aumento significativo dos níveis de *Akt* cerebral, bem como da sua atividade anti-apoptótica, pela administração de etanol (1.5 g/kg ip) em animais após acidente vascular cerebral isquêmico, indicando também um efeito neuroprotetor. Novamente, apenas identificamos uma tendência, sem qualquer significância, da razão *pAkt/tAkt* nos animais tratados com álcool em relação aos que receberam apenas água. Como mencionado para os níveis de *Akt*, deveremos aumentar o “n” dos grupos para verificar a possibilidade de encontrarmos diferenças significativas. De fato, evidências na literatura já mostraram que os animais *icv-STZ* possuem os mecanismos de sinalização da insulina cerebral prejudicados, bem como diminuição da atividade da *Akt* (LESTER-COLL et al., 2006).

6. CONCLUSÕES

O presente estudo fornece evidências dos efeitos de um consumo baixo de álcool sobre modelos com alterações comportamentais e moleculares características de DA esporádica relacionada com resistência cerebral a insulina. Embora o tratamento com etanol 3% por 4 semanas não tenha sido capaz de atenuar as alterações de memória espacial detectadas nos modelos *icv-STZ* e *WAR*, nenhum prejuízo cognitivo foi observado em animais cognitivamente saudáveis ou dano adicional nos modelos com prejuízo nos processos consolidação de memória. A velocidade de natação dos animais *icv-STZ*, entretanto, foi aumentada pelo tratamento com álcool, o que pode estar relacionado a uma estratégia de navegação dos animais desse grupo. Ademais, foi possível identificar um aumento endógeno dos níveis de *Akt* fosforilada no hipocampo dos animais *WAR* que receberam apenas água, sugerindo uma maior atividade dessa proteína nesse modelo. Não identificamos diferenças nos níveis de ativação da *Akt* (*pAkt/tAkt*) entre os animais tratados com álcool em relação aos que receberam apenas água, indicando que o consumo baixo de etanol (3%) não é capaz de influenciar a atividade da *Akt* cerebral, o que torna nossos dados comportamentais condizentes com a análise molecular.

Juntos, os dados sugerem que um consumo baixo de álcool, nas condições aplicadas, não é capaz de melhorar ou agravar os prejuízos na memória de modelos com fenótipos característicos da DAe, ou de influenciar nos processos de consolidação de memória de animais cognitivamente saudáveis. Assim, apesar dos dados serem ainda insuficientes para afirmar efeitos benéficos de um consumo baixo de álcool sobre a DA e de ser necessário mais estudos com diferentes concentrações e durações do tratamento com álcool, análise de outras proteínas da via de sinalização insulínica cerebral e maior “n” amostral, acreditamos que o conhecimento desses efeitos é de extrema importância para a compreender interconexão entre hábitos de vida e a fisiopatologia da doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, S. K.; ROSS, E. L.; SWARTZWELDER, H. S. Age-independent and dose-response effects of ethanol on spatial memory in rats. **Alcohol** 23, p. 167–175, 2001.
- ALJANABI, N. M. et al. Alzheimer's and Hyperglycemia: Role of the Insulin Signaling Pathway and GSK-3 Inhibition in Paving a Path to Dementia. **Cureus**, 5 fev. 2020.
- ALKANA, R. L.; PARKER, E. S. **Memory Facilitation by Post-Training Injection of Ethanol****Psychopharmacology**. [s.l: s.n.].
- ALVES, S. S. et al. Insulin Resistance as a Common Link between Current Alzheimer's Disease Hypotheses. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 82, n. 1, p. 71–105, 2021.
- ALVES, S. S. et al. A Genetic Model of Epilepsy with a Partial Alzheimer's Disease-Like Phenotype and Central Insulin Resistance. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 6, p. 3721–3737, 1 jun. 2022.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Alzheimer's Disease Facts and Figures**. [s.l: s.n.].
- ANGELOVA, H. et al. Effects of kyotorphin on the early behavioural and histological changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease in rats. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, v. 71, n. 3, p. 424–430, 2018.
- ANISMAN, H.; MCINTYRE, D. C. **Conceptual, Spatial, and Cue Learning in the Morris Water Maze in Fast or Slow Kindling Rats: Attention Deficit Comorbidity**. [s.l: s.n.].
- ANSTEY, K. J.; PETERS, R. Alcohol and dementia — risk or protective factor? **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 11, p. 635–636, 2018.
- ARENDT, T. et al. **CHOLINERGIC SYSTEM AND MEMORY IN THE RAT: EFFECTS OF CHRONIC ETHANOL, EMBRYONIC BASAL FOREBRAIN BRAIN TRANSPLANTS AND EXCITOTOXIC LESIONS OF CHOLINERGIC BASAL FOREBRAIN PROJECTION SYSTEM****Neuroscience**. [s.l: s.n.].
- ARNOLD, S. E. et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: Concepts and conundrums. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 3, p. 168–181, 2018.
- AVOGARO, A. et al. Glucose tolerance during moderate alcohol intake: Insights on insulin action from glucose/lactate dynamics. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 3, p. 1233–1238, 2002.
- BACHMAN, D. L. et al. Comparison of Alzheimer ' s disease risk factors in white and African American families. p. 1372–1375, 2003.
- BAKER, L. D. et al. Metabolism for Cognitively Normal Adults With Pre-. **Arch Neurol**, v. 68, n. 1, p. 51–57, 2012.
- BANKS, W. A. et al. **Transport of Insulin Across the Blood-Brain Barrier: Saturability at Euglycemic Doses of Insulin**. [s.l: s.n.].
- BARANELLO, R. et al. Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 12, n. 1, p. 32–46, 2015.
- BARON, A. D. Insulin resistance and vascular function. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 16, n. 1, p. 92–102, 2002.

- BATE, C.; WILLIAMS, A. Ethanol protects cultured neurons against amyloid- β and α -synuclein-induced synapse damage. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1406–1412, 2011.
- BELL, R. A. et al. Associations between alcohol consumption and insulin sensitivity and cardiovascular disease risk factors: The insulin resistance and atherosclerosis study. **Diabetes Care**, v. 23, n. 11, p. 1630–1636, 2000.
- BELMADANI, A. et al. Inhibition of amyloid- β -induced neurotoxicity and apoptosis by moderate ethanol preconditioning. **NeuroReport**, v. 15, n. 13, p. 2093–2096, 2004.
- BLOCH, K. et al. Intracerebroventricular streptozotocin induces obesity and dementia in lewis rats. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 60, n. 1, p. 121–136, 2017.
- BOERNGEN-LACERDA, R.; LUCIA, M.; SOUZA-FORMIGONI, O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2000.
- BOTION, L. M.; DORETTO, M. C. Changes in peripheral energy metabolism during audiogenic seizures in rats. **Physiology and Behavior**, v. 78, n. 4–5, p. 535–541, 2003.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding** ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. [s.l: s.n.].
- BRENNAN, S. E. et al. Long-term effects of alcohol consumption on cognitive function: A systematic review and dose-response analysis of evidence published between 2007 and 2018. **Systematic Reviews**, v. 9, n. 1, 13 fev. 2020.
- BROE, G. A. et al. Health habits and risk of cognitive impairment and dementia in old age: A prospective study on the effects of exercise, smoking and alcohol consumption. v. 22, n. 5, p. 621–623, 1998.
- CACACE, S. et al. Evaluation of chronic alcohol self-administration by a 3-bottle choice paradigm in adult male rats. Effects on behavioural reactivity, spatial learning and reference memory. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 2, p. 213–220, 1 jun. 2011.
- CASTRO, G. P. et al. Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. **Epilepsy and Behavior**, v. 71, p. 243–249, 1 jun. 2017.
- CHEN, Y. et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). **Molecular neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 711–725, 2013.
- COLLINS, M. A. et al. Moderate ethanol preconditioning of rat brain cultures engenders neuroprotection against dementia-inducing neuroinflammatory proteins: Possible signaling mechanisms. **Molecular Neurobiology**, v. 41, n. 2–3, p. 420–425, 2010.
- CORDAIN, L. et al. Influence of moderate chronic wine consumption on insulin sensitivity and other correlates of syndrome X in moderately obese women. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 11, p. 1473–1478, 2000.
- CORREA, M.; MIQUEL, M.; ARAGON, C. M. G. **Lead Acetate Potentiates Brain Catalase Activity and Enhances Ethanol-Induced Locomotion in Mice** Pharmacology Biochemistry and Behavior. [s.l: s.n.].

- CRAFT, S. Insulin Resistance and Alzheimers Disease Pathogenesis: Potential Mechanisms and Implications for Treatment. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 2, p. 147–152, 2007.
- CROSS, D. A. E. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, p. 703–706, 1995.
- CULLEN, C. L. et al. Low dose prenatal alcohol exposure does not impair spatial learning and memory in two tests in adult and aged rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 30 jun. 2014.
- CULLMANN, M.; HILDING, A.; ÖSTENSON, C. G. Alcohol consumption and risk of pre-diabetes and type 2 diabetes development in a Swedish population. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 4, p. 441–452, 2012.
- CUMMINGS, J. L.; TONG, G.; BALLARD, C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 67, n. 3, p. 779–794, 2019.
- CUNHA, A. O. S. et al. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. **Neuroscience**, v. 310, p. 114–127, 3 dez. 2015.
- DE LA MONTE, S. M.; TONG, M.; WANDS, J. R. The 20-Year Voyage Aboard the Journal of Alzheimer's Disease: Docking at "Type 3 Diabetes", Environmental/Exposure Factors, Pathogenic Mechanisms, and Potential Treatments. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 62, n. 3, p. 1381–1390, 2018.
- DECHANDT, C. R. P. et al. Energy Metabolism and Redox State in Brains of Wistar Audiogenic Rats, a Genetic Model of Epilepsy. **Frontiers in Neurology**, v. 10, 1 out. 2019.
- DENG, J. et al. A 2-year follow-up study of alcohol consumption and risk of dementia. v. 108, p. 378–383, 2006.
- DOLL, R. et al. Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. **Bmj**, v. 309, n. 6959, p. 911, 1994.
- DORSZEWSKA, J. et al. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 9, p. 952–963, 2016.
- EL SAYED, N. S.; GHONEUM, M. H. Antia, a Natural Antioxidant Product, Attenuates Cognitive Dysfunction in Streptozotocin-Induced Mouse Model of Sporadic Alzheimer's Disease by Targeting the Amyloidogenic, Inflammatory, Autophagy, and Oxidative Stress Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.
- ELDAR-FINKELMAN, H. Glycogen synthase kinase 3: An emerging therapeutic target. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 126–132, 2002.
- ELSAED EBADA, M. et al. Corticosterone protects against memory impairments and reduced hippocampal BDNF levels induced by a chronic low dose of ethanol in C57BL/6J mice. **Rom J Morphol Embryol**, v. 55, n. 4, p. 1303–1316, 2014.
- FACCHINI, F.; CHEN, Y. D. I.; REAVEN, G. M. Light-to-moderate alcohol intake is associated with enhanced insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 17, n. 2, p. 115–119, 1994.
- FARR, S. A. et al. Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 29, n. 6, p. 971–982, jun. 2005.
- FAZAN, R. et al. Changes in autonomic control of the cardiovascular system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain. **Epilepsy and Behavior**, v. 22, n. 4, p. 666–670, dez. 2011.

- FAZAN, R. et al. Evaluation of cardiovascular risk factors in the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2015.
- FDA, F. AND D. A. Aduhelm (aducanumab-avwa) injection. n. 4, 2021.
- FILATOVA, E. V. et al. Comparative Study of the Behavior of Wistar Rats, Dopamine Transporter Heterozygous Rats and Rats after Long-Term Ethanol Consumption in the Morris Water Maze. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 58, n. 5, p. 1653–1663, 31 set. 2022.
- FIOCRUZ, F. O. C. III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira. 2017.
- FLANAGAN, D. E. H. et al. Alcohol consumption and insulin resistance in young adults. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 4, p. 297–301, 2000.
- FLICKER, L. Modifiable lifestyle risk factors for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 3, p. 803–811, 2010.
- FRATIGLIONI, L. et al. Risk factors for late- onset Alzheimer's disease: A population- based, case-control study. **Annals of Neurology**, v. 33, n. 3, p. 258–266, 1993.
- FREUND, G.; BALLINGER, W. E. Alzheimer ' s Disease and Alcoholism : Possible Interactions. v. 9, n. 3, p. 233–240, 1992.
- FRIDMAN, C. et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, n. 1, p. 19–25, 2004.
- FRÖLICH, L. et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 105, n. 4–5, p. 423–438, 1998.
- FURUYA, D. T. et al. Low ethanol consumption induces enhancement of insulin sensitivity in liver of normal rats. **Life Sciences**, v. 77, n. 15, p. 1813–1824, 2005.
- FURUYA, D. T.; BINSACK, R.; MACHADO, U. F. Low ethanol consumption increases insulin sensitivity in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 1, p. 125–130, 2003.
- GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Diuresis and natidiuresis in non-seizing and in kindled rats from a genetically audiogenic susceptible strain. **Neurophysiology, Basic and Clinical**, v. 5, p. 1873–1876, 1994.
- GARCIA-CAIRASCO, N. et al. **Reduced Exploratory Activity of Audiogenic Seizures in Susceptible Wistar Rats**. **Physiology & Behavior**. [s.l: s.n.].
- GARCIA-CAIRASCO, N.; UMEOKA, E. H. L.; CORTES DE OLIVEIRA, J. A. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. **Epilepsy and Behavior**, v. 71, p. 250–273, 1 jun. 2017.
- GHASEMI, R. et al. The Interplay of Akt and ERK in A β Toxicity and Insulin-Mediated Protection in Primary Hippocampal Cell Culture. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 57, n. 3, p. 325–334, 1 nov. 2015.
- GIVENS, B. **Low Doses of Ethanol Impair Spatial Working Memory and Reduce Hippocampal Theta Activity**. [s.l: s.n.].
- GOLDSTEIN, B. J. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 5 SUPPL., p. 3–10, 2002.

GONG, C. X.; LIU, F.; IQBAL, K. Multifactorial Hypothesis and Multi-Targets for Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 64, n. s1, p. S107–S117, 2018.

GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; TUNG, Y. C. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 13, p. 44913–44917, 1986.

HADI, H. A. R.; AL SUWAIDI, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Vascular Health and Risk Management**, v. 3, n. 6, p. 853–876, 2007.

HAFEEZ, A. et al. Reduced Apoptosis by Ethanol and Its Association with PKC- δ and Akt Signaling in Ischemic Stroke. **Aging and Disease**, p. 366–372, 2014.

HALL, A. O. K. S. et al. Risk factors for incident Alzheimer's disease in African Americans and Yoruba. p. 235–240, 2006.

HANGER, D. P. et al. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. **Neuroscience Letters**, v. 147, n. 1, p. 58–62, 1992.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. **Science**, v. 256, p. 184–185, 1992.

HARWOOD, D. G. et al. The effect of alcohol and tobacco consumption, and apolipoprotein E genotype, on the age of onset in Alzheimer's disease. v. 2030, p. 511–518, 2010.

HEBERT, L. E. et al. Relation of Smoking and Alcohol Consumption to Incident Alzheimer's Disease. v. 135, n. 4, p. 347–355, 1992.

HERNÁNDEZ, F. et al. **GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. Experimental Neurology**, jun. 2010.

HEYMANN, D. et al. The Association Between Alcohol Use and the Progression of Alzheimer's Disease. p. 1356–1362, 2016.

HODGES, H. et al. **The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats** *Behavioural Brain Research*. [s.l: s.n.].

HOMOLAK, J. et al. Additional methodological considerations regarding optimization of the dose of intracerebroventricular streptozotocin A response to: "Optimization of intracerebroventricular streptozotocin dose for the induction of neuroinflammation and memory impairments in rats" by Ghosh et al., Metab Brain Dis 2020 July 21. **Metabolic Brain Disease**, p. 97–102, 2021.

HONG, M.; LEE, V. M. Y. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 31, p. 19547–19553, 1 ago. 1997.

HOYER, S.; LANNERT, H. Inhibition of the neuronal insulin receptor causes Alzheimer-like disturbances in oxidative/energy brain metabolism and in behavior in adult rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 893, p. 301–303, 1999.

HUANG, C. C. et al. Diabetes mellitus and the risk of Alzheimer's disease: A nationwide population-based study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

HUANG, W. et al. Alcohol consumption and incidence of dementia in a community sample aged 75 years and older. v. 55, p. 959–964, 2002.

HUSAIN, K. et al. Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 4, p. 337–343, 2005.

JELLINGER, K. A.; ATTEMS, J. Prevalence and pathogenic role of cerebrovascular lesions in Alzheimer disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 229–230, p. 37–41, 2005.

JURGENS, C. A. et al. β -Cell loss and β -cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition. **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 6, p. 2632–2640, 2011.

JUSTICE, M. et al. Effects of moderate ethanol consumption on lipid metabolism and inflammation through regulation of gene expression in rats. **Alcohol and Alcoholism**, v. 54, n. 1, p. 5–12, 1 jan. 2019.

KAMAT, P. K. **Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism**. **Neural Regeneration Research**Editorial Board of Neural Regeneration Research, , 1 jul. 2015.

KANNEL, W. B.; ELLISON, R. C. Alcohol and coronary heart disease: The evidence for a protective effect. **Clinica Chimica Acta**, v. 246, n. 1–2, p. 59–76, 1996.

KAZKAYASI, I. et al. Intranasal metformin treatment ameliorates cognitive functions via insulin signaling pathway in ICV-STZ-induced mice model of Alzheimer's disease. **Life Sciences**, v. 299, 15 jun. 2022.

KEPP, K. P. Ten Challenges of the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 55, n. 2, p. 447–457, 2017.

KIECHL, S. et al. Insulin sensitivity and regular alcohol consumption: Large, prospective, cross sectional population study (Bruneck study). **British Medical Journal**, v. 313, n. 7064, p. 1040–1044, 1996.

KIM, S. H. et al. Effect of moderate alcoholic beverage consumption on insulin sensitivity in insulin-resistant, nondiabetic individuals. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 58, n. 3, p. 387–392, mar. 2009.

KOK, E. H. et al. Beer Drinking Associates with Lower Burden of Amyloid Beta Aggregation in the Brain: Helsinki Sudden Death Series. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 40, n. 7, p. 1473–1478, 2016.

KOSIK, K. S.; JOACHIM, C. L.; SELKOE, D. J. Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 4044–4048, 1986.

KUHNS, L. et al. **Age-related differences in the effect of chronic alcohol on cognition and the brain: a systematic review**. **Translational Psychiatry**Springer Nature, , 1 dez. 2022.

LAMBERTY, Y.; KLITGAARD, H. Consequences of Pentylenetetrazole Kindling on Spatial Memory and Emotional Responding in the Rat. **Epilepsy and Behavior**, v. 1, n. 4, p. 256–261, ago. 2000.

LANGE, K. W. Movement and Nutrition in Health and Disease Red wine, resveratrol, and Alzheimer's disease | Review. 2018.

- LAO, K. et al. Drug development for Alzheimer's disease: review. **Journal of Drug Targeting**, v. 27, n. 2, p. 164–173, 2019.
- LAZARUS, R.; SPARROW, D.; WEISS, S. T. Alcohol Intake and Insulin Levels. **American journal of epidemiology**, v. 145, n. 10, p. 909–916, 1997.
- LEIBSON, C. L. et al. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: A population-based cohort study. **American Journal of Epidemiology**, v. 145, n. 4, p. 301–308, 1997.
- LESTER-COLL, N. et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: Relevance to sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 9, n. 1, p. 13–33, 2006.
- LI, D. et al. Streptozotocin induces mild cognitive impairment at appropriate doses in mice as determined by long-term potentiation and the morris water maze. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 54, n. 1, p. 89–98, 23 ago. 2016.
- LIMA, N. K. C. et al. Prevalence of insulin resistance and related risk factors for cardiovascular disease in patients with essential hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 22, n. 1, p. 106–111, 2009.
- LINDNER, M. D. **Reliability, Distribution, and Validity of Age-Related Cognitive Deficits in the Morris Water Maze****NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY**. [s.l: s.n.].
- LINDSAY, J. et al. Risk Factors for Alzheimer ' s Disease : A Prospective Analysis from the Canadian Study of Health and Aging. v. 156, n. 5, p. 445–453, 2002.
- LUCHSINGER, J. A. et al. Alcohol Intake and Risk of Dementia. p. 540–546, 2004.
- LUKOYANOV, N. V. et al. Synaptic reorganization in the hippocampal formation of alcohol-fed rats may compensate for functional deficits related to neuronal loss. **Alcohol**, v. 20, n. 2, p. 139–148, 2000.
- M. WEI, L. GIBBONS, T. MITCHELL, J. KAMPERT, S. B. Alcohol Intake and Incidence of Type 2. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 18–24, 2000.
- MACIEJAK, P. et al. **Related papers RECENT FINDINGS IN KYNURENINE RESEARCH IN T HE FIELD OF EXPERIMENTAL EPILEPSY AND....** [s.l: s.n.].
- MAKIN, S. Makin 2018 Nature Outlook - The amyloid hypothesis on trial. **Nature**, v. 559, n. Supplement, p. S4–S7, 2018.
- MANDELKOW, E. M. et al. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. **FEBS Letters**, v. 314, n. 3, p. 315–321, 1992.
- MARKWIESE, B. J. et al. **Differential Effects of Ethanol on Memory in Adolescent and Adult Rats**. [s.l: s.n.].
- MATTHEWS, D. B. et al. Acute Ethanol Administration and Acute Allopregnanolone Administration Impair Spatial Memory in the Morris Water Task. 2002.
- MELCHIOR, C. L.; GLASKY, I. A. J.; RITZMANN, R. F. **A Low Dose of Ethanol Impairs Working Memory in Mice in a Win-Shift Foraging Paradigm****Alcohol**. [s.l: s.n.].
- MELIS, F. et al. **CHRONIC ETHANOL CONSUMPTION IN RATS: CORRELATION BETWEEN MEMORY PERFORMANCE AND HIPPOCAMPAL ACETYLCHOLINE RELEASE IN VIVO****Pergamon Neuroscience**. [s.l: s.n.].

MICHAEL GAZIANO, J. et al. Light-to-moderate alcohol consumption and mortality in the physicians' health study enrollment cohort. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 1, p. 96–105, 2000.

MILES, W. R.; ROOT, H. F. Psychologic tests applied to diabetic patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 30, n. 6, p. 767–777, 1922.

MÖLLER, H.-J.; GRAEBER, M. B. The case described by Alois Alzheimer in 1911. 1998.

MOLONEY, A. M. et al. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 2, p. 224–243, 2010.

MONTE, S. M. DE; WANDS, J. R. Monte, Wands - 2005 - Review of insulin and insulin-like growth factor expression , signaling , and malfunction in the central nervous system Relevance to Alzheimer ¢'s dise.pdf. v. 7, p. 45–61, 2005.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47–60, 1984.

MORRIS, R. G. M. **Synaptic Plasticity and Learning: Selective Impairment of Learning in Rats and Blockade of Long-Term Potentiation in vivo by the IV-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist AP5**. [s.l: s.n].

MUÑOZ, G. et al. Low concentrations of ethanol protect against synaptotoxicity induced by Aβ in hippocampal neurons. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 2, p. 845–856, 2015.

NANCHAHAL, K.; ASHTON, W. D.; WOOD, D. A. Alcohol consumption, metabolic cardiovascular risk factors and hypertension in women. **International Journal of Epidemiology**, v. 29, n. 1, p. 57–64, 2000.

O'NEILL, C. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: Impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 7, p. 647–653, 2013.

OTT, A. et al. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. **Neurology**, v. 53, n. 9, p. 1937–1942, 1999.

PADDA, I. S.; PARMAR, M. Aducanumab. **StatPearls**, 2021.

PARDRIDGE, W. M.; EISENBERG, J.; YANG, J. **Human Blood-Brain Barrier Insulin Receptor**. [s.l: s.n].

PEILA, R.; RODRIGUEZ, B. L.; LAUNER, L. J. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1256–1262, 2002.

PERLMUTTER, J. S. Aducanumab: look before leaping. **Nature Medicine**, v. 27, n. 9, p. 1497, 2021.

PHIEL, C. J. et al. GSK-3a regulates production of Alzheimer's disease amyloid-β peptides. **Nature**, v. 17, n. lane 2, p. 1–5, 2003.

PIETRASZEK, A.; GREGERSEN, S.; HERMANSEN, K. Alcohol and type 2 diabetes. A review. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 5, p. 366–375, 2010.

PLUM, L.; SCHUBERT, M.; BRÜNING, J. C. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 59–65, 2005.

- POHORECKY, L. A. **Biphasic Action of Ethanol** I Biobehavioral Reviews. [s.l: s.n.].
- QIAO, L. Y. et al. Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10625–10632, 1999.
- RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1439–1452, 30 nov. 2006.
- RÄIHÄ, I. et al. Environmental differences in twin pairs discordant for Alzheimer ' s disease. p. 785–787, 1998.
- RICHARD, E.; DEN BROK, M. G. H. E.; VAN GOOL, W. A. Bayes analysis supports null hypothesis of anti-amyloid beta therapy in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, v. 17, n. 6, p. 1051–1055, 2021.
- RIMM, E. B. et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. **The Lancet**, v. 338, n. 8765, p. 464–468, 1991.
- ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; GRANADOS-SOTO, V. **Resveratrol: A natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases**. CNS Neuroscience and Therapeutics, set. 2008.
- ROSEN, J. et al. Effects of a History of Heavy Alcohol Consumption Alzheimer ' s Disease on established. 1993.
- SABIA, S. et al. Alcohol consumption and risk of dementia: 23 year follow-up of Whitehall II cohort study. **BMJ (Online)**, v. 362, 2018.
- SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 5, p. 765–772, 2011.
- SANTÍN, L. J. et al. **Effects of chronic alcohol consumption on spatial reference and working memory tasks** Alcohol. [s.l: s.n.].
- SANTOS ALVES, S. **Wistar Audiogenic Rat (WAR): um possível modelo para o estudo da doença de Alzheimer relacionada com resistência à insulina**. [s.l.] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto , 2018.
- SCHNAIDER BEERI, M. et al. Diabetes mellitus in midlife and the risk of dementia three decades later. **Neurology**, v. 63, n. 10, p. 1902–1907, 2004.
- SCHRIJVERS, E. M. C. et al. Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: The Rotterdam Study. **Neurology**, v. 75, n. 22, p. 1982–1987, 2010.
- SCHUBERT, M. et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 18, p. 7084–7092, 2003.
- SCHWARZINGER, M. et al. Contribution of alcohol use disorders to the burden of dementia in France 2008–13: a nationwide retrospective cohort study. **The Lancet Public Health**, v. 3, n. 3, p. e124–e132, 2018.
- SELKOE, D. J. Physiological production of the β -amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. **Trends in Neurosciences**, v. 16, n. 10, p. 403–409, 1993.
- SHERAFAT, M. A. et al. Kindling-induced learning deficiency and possible cellular and molecular involved mechanisms. **Neurological Sciences**, v. 34, n. 6, p. 883–890, jun. 2013.

SIERKSMA, A. et al. Effect of moderate alcohol consumption on Adiponectin, Tumor Necrosis Factor- α , and Insulin Sensitivity. **Pathophysiology/Complications**, v. 150, n. 49, p. 2218–2221, 2004.

STEEN, E. et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease - Is this type 3 diabetes? **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 7, n. 1, p. 63–80, 2005.

TSOLAKI, M. et al. Risk Factors for Clinically Diagnosed Alzheimer's Disease: A Case-Control Study of a Greek Population. v. 9, n. 3, p. 327–341, 1997.

UMEOKA, E. H. L. et al. Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. **Brain Research**, v. 1381, p. 141–147, 24 mar. 2011.

VAN DIJK, G. et al. Integrative neurobiology of metabolic diseases, neuroinflammation, and neurodegeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. APR, p. 1–19, 2015.

VASDEV, S.; GILL, V.; SINGAL, P. K. Beneficial effect of low ethanol intake on the cardiovascular system: Possible biochemical mechanisms. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 3, p. 263–276, 2006.

VERAS, R. P. et al. Avaliação dos gastos com o cuidado do idoso com demência. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 34, n. 1, p. 5–12, 2007.

VERDILE, G. et al. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

VILLEGRAS, R. et al. Alcohol intake and insulin resistance. A cross-sectional study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 14, n. 5, p. 233–240, 2004.

VINGTDEUX, V. et al. **Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease**. BMC Neuroscience. **Anais...** 10 dez. 2008.

VISHWAKARMA, S. et al. GABAergic effect of valeric acid from Valeriana wallichii in amelioration of ICV STZ induced dementia in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 4, p. 484–489, 2016.

VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 848–858, jul. 2006.

WALKER, D. W. et al. Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. **Science**, v. 209, n. 4457, p. 711–713, 1980.

WALLER, M. B. et al. **Effect of Low Dose Ethanol on Spontaneous Motor Activity in Alcohol-Preferring and-Nonpreferring Lines of Rats I**. [s.l: s.n.].

WANG, J. et al. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates A β neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 13, p. 2313–2320, nov. 2006.

WANG, Z. T. et al. Associations of alcohol consumption with cerebrospinal fluid biomarkers of alzheimer's disease pathology in cognitively intact older adults: The CABLE study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 82, n. 3, p. 1045–1054, 2021.

WHITE M., A.; SIMSON E., P.; J. BEST, P. Comparison between the effects of ethanol and diazepam on spatial working memory in the rat. **Psychopharmacology**, 1997.

WILDEN, P. A. et al. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 19, p. 13719–13727, 1992.

WILLETTE, A. A. et al. Insulin resistance, brain atrophy, and cognitive performance in late middle-aged adults. **Diabetes Care**, v. 36, n. 2, p. 443–449, 2013.

WOLFFGRAMM, J. **Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions** *Psychopharmacology*. [s.l.] Springer-Verlag, 1990.

WORLD ALZHEIMER REPORT. **World Alzheimer Report 2022 – Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support**. [s.l: s.n.].

YOSHITAKE, T.; KIYOHARA, Y.; KATO, I. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer 's disease in a defined elderly Japanese population : The Hisayama Study. 1995.