Olívia Furiama Metropolo Dias

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA DOENÇA DE ALZHEIMER ATRAVÉS DA MENSURAÇÃO DOS OLIGOELEMENTOS SÉRICOS NO MODELO ANIMAL 3xTg-AD

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

São Paulo

2025

Olívia Furiama Metropolo Dias

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA DOENÇA DE ALZHEIMER ATRAVÉS DA MENSURAÇÃO DOS OLIGOELEMENTOS SÉRICOS NO MODELO ANIMAL 3xTg-AD

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Lionel Fernel Gamarra Contreras

São Paulo

2025

Dias, Olívia Furiama Metropolo
Avaliação de biomarcadores para doença de Alzheimer através da mensuração dos oligoelementos séricos no modelo animal 3xTg-AD / Olívia Furiama Metropolo Dias. -- São Paulo, 2025.
xvii, 99 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Evaluation of biomarkers for alzheimer's disease through measurement of serum trace elements in the 3xTg-AD animal model.*

1. Doença de Alzheimer. 2. Espectometria de massa com plasma indutivamente acoplado ICP-MS. 3. Biomarcadores. 4. Oligoelementos. 5. Comportamento animal.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Olívia Furiama Metropolo Dias

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA DOENÇA DE ALZHEIMER ATRAVÉS DA MENSURAÇÃO DOS OLIGOELEMENTOS SÉRICOS NO MODELO ANIMAL 3xTg-AD

Presidente da banca: Prof. Dr. Lionel Fernel Gamarra Contreras

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:
Profa. Dra. Érika Bevilaqua Rangel
Dra. Jessica Ruivo Maximino
Profa. Dra. Luciana Cavalheiro Marti

Membros suplentes:
Dr. Ernanni Damião Vieira
Profa. Dra. Andréa Laurato Sertié

Aprovada em: 02/04/2025.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, principalmente minha mãe, Ana Paula e minha tia, Isabel, por todo apoio e dedicação em todas as etapas da minha jornada profissional e acadêmica, pelo amor incondicional e suporte em todas as minhas decisões. Ao meu namorado, Kaic Laet, pela paciência, suporte e por permanecer ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis nos quais foi posto a prova nosso amor e cumplicidade.

Aos meus queridos amigos, que a presença tornava cada dia mais alegre e acolhedor, mesmo nos dias mais monótonos. Aos meus colegas do Grupo Nano, pelo apoio e suporte quando foi preciso.

À equipe CETEC por sempre cuidar bem dos meus animais, assim como todos os outros, mostrando sempre respeito à vida e compromisso com a pesquisa pré-clínica.

À minha psicóloga Marina, e psiquiatra Ayodele, que acima de tudo me mantiveram sã, na maioria das vezes, ao longo de todo o processo, e me mostraram uma luz no fim do túnel quando nada mais fazia sentido.

Em especial ao Prof. Dr. Lionel Fernel Gamarra, que tanto me ensinou ao longo dos anos em que trabalhamos juntos, por me oferecer um lugar e grandes oportunidades, e ao Dr. Javier Bustamante Mamani, por todos os ensinamentos e paciência, e por sempre mostrar o lado positivo das coisas.

À Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde da Faculdade Israelita Brasileira Albert Einstein, ao Dr. Luciano de Azevedo e a toda a equipe do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa (IIEP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa (88887.849623/2023-00) concedida para realização desse projeto.

Sumário

Agradecimentos v
Lista de figuras ix
Lista de tabelas xi
Lista de abreviaturas xii
Resumo xvi
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Epidemiologia da doença de Alzheimer 1
1.2 Fisiopatologia da doença de Alzheimer 4
1.3 Métodos de diagnóstico e detecção da doença de Alzheimer 7
1.4 Biomarcadores convencionais 10
1.5 Oligoelementos como biomarcadores da doença de Alzheimer 13
1.6 Detecção dos oligoelementos mediante técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado 17
1.7 Princípio de funcionamento pela técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado para a deteção dos oligoelementos 18
1.7.1 Nebulização e introdução da amostra 19
1.7.2 Ionização no plasma de argônio 20
1.7.3 Separação dos íons por massa/carga 20
1.7.4 Detecção e quantificação 20
1.7.5 Cela de reação dinâmica 21
1.8 Modelos pré-clínicos para o estudo da doença de Alzheimer 21
1.8.1 Modelos espontâneos 22
1.8.2 Modelos intervencionistas 22
1.8.3 Modelos geneticamente modificados 23
1.8.3.1 Modelo 3xTg-AD para investigação dos mecanismos combinados de amiloide e tau 24
1.9 Comportamento animal na avaliação da doença de Alzheimer 26
1.10 Objetivos 28
2 MÉTODOS 29
2.1 Animais 31
2.2 Desenho experimental 31

2.3 Avaliação comportamental 33
2.3.1 Locomoção espontânea por campo aberto 33
2.3.2 Teste de labirinto aquático de Morris.....35
2.3.3 Teste de reconhecimento de objeto novo.....37
2.4 Anestesia e eutanásia 38
2.5 Determinação dos oligoelementos em amostras do soro por ICP-MS 38
2.5.1 Reagentes e produtos químicos.....38
2.5.2 Coleta e pré-preparo das amostras de sangue 39
2.5.3 Digestão de amostras de soro para medidas quantitativas por ICP-MS 39
2.5.4 Curvas de calibração e uso de soluções padrão de referência certificados para análise quantitativa por ICP-MS 40
2.5.5 Análise por ICP-MS e parâmetros instrumentais.....40
2.5.6 Avaliação da sensibilidade e especificidade dos oligoelementos das amostras de soro por ICP-MS.....41
2.5.7 Branco e calibração do branco 41
2.5.8 Otimização da cela de reação dinâmica para medidas quantitativas via ICP-MS 42
2.5.9 Limites de detecção e quantificação.....43
2.6 Avaliação dos níveis do peptídeo Aβ no sistema nervoso central, mediante a técnica de imunohistoquímica.....43
2.7 Análises estatísticas 44
3 RESULTADOS.....45
3.1 Avaliação comportamental nos períodos matutino e vespertino.....45
3.1.1 Locomoção espontânea em campo aberto.....45
3.1.2 Teste de labirinto aquático de Morris.....50
3.1.2 Teste de reconhecimento de objeto novo.....52
3.2 Avaliação comportamental para doença de Alzheimer.....54
3.2.1 Locomoção espontânea por campo aberto 54
3.2.1 Teste de labirinto aquático de Morris.....59
3.2.2 Teste de reconhecimento de objeto novo.....62
3.3 Determinação dos oligoelementos em amostras de soro por ICP-MS 67
3.3.1 Obtenção da curva de calibração no processo de quantificação dos oligoelementos na amostra do plasma 68
3.3.2 Quantificação dos oligoelementos na amostra do plasma mediante a técnica de ICP-MS 71

3.4 Avaliação dos níveis do peptídeo Aβ no sistema nervoso central, mediante a técnica de imunohistoquímica.....76
4 DISCUSSÃO.....79
5 CONCLUSÕES 87
6 REFERÊNCIAS 88
Abstract

Lista de figuras

Figura 1. Prevalência global de demência por faixa etária e sexo em 2019 e 2050 2
Figura 2. Fases da doença de Alzheimer e agravamento dos sintomas 3
Figura 3. Comparação entre cérebro saudável e acometido pela doença de Alzheimer 4
Figura 4. Mecanismos normal e irregular da clivagem da proteína precursora amiloide 5
Figura 5. Processo de desestabilização dos microtúbulos neurais.....6
Figura 6. Aparecimento das placas Aβ *versus* a progressão da demência da doença de Alzheimer.....8
Figura 7. Desregulação da homeostase do zinco na doença de Alzheimer 15
Figura 8. Desregulação da homeostase do cobre na doença de Alzheimer.....17
Figura 9. Representação do mecanismo de detecção da ICP-MS 19
Figura 10. Caracterização do modelo transgênico 3xTg-AD 25
Figura 11. Desenho experimental do estudo 29
Figura 12. Desenho experimental da avaliação comportamental para investigar a influência dos períodos manhã e tarde.....32
Figura 13. Desenho experimental que compreende os experimentos de coleta de sangue, avaliação comportamental e eutanásia para coleta do cérebro e avaliação imunohistoquímica.....32
Figura 14. Equipamento para o teste de campo aberto no modelo animal, actômetro .34
Figura 15. Representação do experimento labirinto aquático de Morris.....36
Figura 16. Representação do experimento teste de reconhecimento de objeto novo ..37
Figura 17. Movimento espontâneo horizontal e vertical utilizando o actômetro.....46
Figura 18. Desempenho no labirinto aquático de Morris por sexo e horário do dia.....50
Figura 19. Avaliação comportamental no teste de reconhecimento de objeto novo, ao longo do dia e do sexo 53
Figura 20. Frequência de movimentos horizontais ao longo dos 12 meses dos Grupos Controle, na cor cinza e Grupo Doença de Alzheimer, na cor vermelha 56
Figura 21. Frequência de movimentos verticais ao longo dos 12 meses 58
Figura 22. Teste de labirinto aquático de Morris, análise da variável latência em segundos ao longo de 12 meses.....60
Figura 23. Velocidade teste de labirinto aquático de Moris, análise da variável velocidade em centímetros por segundo ao longo de 12 meses.....61

Figura 24. Índice de reconhecimento de objeto novo ao longo de 12 meses 63
Figura 25. Exploração total do teste de reconhecimento do objeto novo ao longo de 12 meses.....66
Figura 26. Velocidade do teste de reconhecimento do objeto novo ao longo de 12 meses 67
Figura 27. Curva de calibração do zinco para o isótopo 64.....68
Figura 28. Curva de calibração do cobre para o isótopo 63 69
Figura 29. Curva de calibração do selênio para o isótopo 78.....70
Figura 30. Análise da concentração de cobre ao longo dos 12 meses.....72
Figura 31. Análise da concentração de selênio ao longo dos 12 meses 73
Figura 32. Análise da concentração de zinco ao longo dos 12 meses 75
Figura 33. Imunomarcação de β-amiloide no córtex encefálico de animais transgênicos 3xTg-AD em diferentes períodos experimentais.....78

Lista de tabelas

Tabela 1. Condições de análise do equipamento ICP-MS.....41
Tabela 2. Análises descritivas e de ANOVA da frequência de movimento em cada parâmetro no teste de movimento espontâneo, considerando os movimentos horizontais rápidos e lentos (MOV-R e MOV-L) e movimentos verticais rápidos e lentos (REA-R e REA-L) por sexo (feminino e masculino), hora do dia (manhã e tarde) e seção (dias 0, 7 e 14).....47
Tabela 3. Análises descritivas e de ANOVA do teste do labirinto aquático de Morris sobre a latência de escape, o tempo de exploração por quadrantes, a velocidade média por sexo (feminino e masculino) e a hora do dia (manhã e tarde).....51
Tabela 4. Análise descritiva e de ANOVA do teste de reconhecimento de objeto novo sobre o índice de reconhecimento (RI), tempo total de exploração, velocidade média por sexo (feminino e masculino) e hora do dia (manhã e tarde).....54
Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos para os isótopos dos elementos Zinco, Selênio e Cobre.....70
Tabela 6. Descrição e resultado do teste t de Student da concentração de cobre entre os Grupos.....72
Tabela 7. Descrição e resultado do teste t de Student da concentração de selênio entre os Grupos.....74
Tabela 8. Descrição e resultado do teste t de Student da concentração de zinco entre os Grupos Doença de Alzheimer e Grupo Controle em cada mês analisado e ao longo dos meses pelo teste de ANOVA.....75

Lista de abreviaturas

3xTg-AD	Linhagem de camundongo triplo transgênico (APP, PS1 e tau)
5xFAD	Linhagem de camundongo com três mutações em APP e duas mutações em PS1
^{18}F-FDG-PET	Tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose marcada com flúor-18 (*Fluorodeoxyglucose positron emission tomography using fluorine-18*)
AAALAC	*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*
Aβ	Beta amiloide (*Amyloid beta*)
Al	Alumínio
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide (*Amyloid-beta precursor protein*)
APPswe	Mutação Sueca no gene APP
BEC	Concentração equivalente ao fundo (*Background equivalent concentration)*
BSA	Albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)
C57BL/6	Linhagem consanguínea de camundongos de pelagem preta, sub-linhagem 6
Ca	Cálcio
CA1	Cornu ammonis 1
CA3	Cornu ammonis 3
CCL	Comprometimento cognitivo leve
CDK5	Quinase dependente de ciclina 5 (*Cyclin-dependent kinase 5*)
CETEC	Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
Co	Cobalto
CTR1	Proteína de captação de cobre de alta afinidade 1 (*High affinity copper uptake protein 1*)
Cu	Cobre
DA	Doença de Alzheimer
DAB	Diaminobenzidina

DLD	Depressão de longa duração
DRC	Célula de reação dinâmica (*Dynamic reaction cell*)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
ERK1/2	Proteínas quinases extracelular reguladas por sinal 1 e 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (*Glial fibrillary acidic protein*)
GSH	Glutationa
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3 beta (*Gycogen synthase kinase 3 beta*)
HDPE	Polietileno de alta densidade (*High density polyethylene*)
Hg	Mercúrio
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HNO_3	Ácido nítrico
IBA-1	Proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1 (*Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*)
IIEP	Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LAM	Labirinto aquático de Morris
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPT P301L	*Microtubule-associated protein tau mutation*
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
M/Z	Massa/carga
NE	Nordeste
NFTs	Emaranhados neurofibrilares (*Neurofibrilary tangles*)
Ni	Níquel
NO	Noroeste

O_2	Oxigênio
OCT	*Optimal cutting temperature*
Pb	Chumbo
PET	Tomografia por emissão de pósitrons (*Positron emission tomography*)
PET-amiloide	Tomografia por emissão de pósitrons com marcador beta amiloide (*Positron emission tomography for amyloid imaging*)
PET-FDG	Tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose (*Positron emission tomography using fluorodeoxyglucose*)
PLD	Potenciação de longa duração
PP2A	Proteína fosfatase 2
ppb	Partes por bilhão
ppt	Partes por trilhão
PS1M146V	Mutação no gene presenilina 1
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
p-tau	Proteína tau fosforilada (*Phosphorylated tau*)
R	Coeficiente de Pearson
Rd	Ródio
RI	Índice de reconhecimento (*Recognition index*)
RM	Ressonância magnética
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
Se	Selênio
SE	Sudeste
SNC	Sistema nervoso central
SO	Sudoeste
SOD1	Superóxido deismutase 1
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (*Single-photon emission computerized tomography*)
T_F	Tempo de exploração do objeto familiar
T_N	Tempo de exploração do novo objeto
TauP301L	Gene da proteína tau
TC	Tomografia computadorizada
TCA	Teste de campo aberto
ThT	Tioflavina-T

TOF	Tempo de voo (*Time-of-flight*)
TRO	Teste de reconhecimento de objeto
t-tau	Proteína tau total (*Total tau*)
ZIP	Proteína transportadora regulada por zinco, regulada por ferro (*Zinc regulated transporter-like Iron regulated transporter-like protein*)
Zn	Zinco
ZnT	Proteína transportadora de zinco (*Zinc transporter*)

Resumo

Introdução: A doença de Alzheimer é uma condição neurodegenerativa progressiva e a principal causa de demência em idosos, afetando mais de 55 milhões de pessoas no mundo, com estimativa de atingir 139 milhões até 2050. Caracteriza-se pela formação de placas beta-amiloides e emaranhados neurofibrilares, que levam à disfunção sináptica e à atrofia cerebral. A identificação de biomarcadores confiáveis é crucial para o diagnóstico precoce, monitoramento da progressão da doença e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, especialmente diante do aumento crescente da sua prevalência. **Objetivos:** Avaliar biomarcadores da doença de Alzheimer por meio da quantificação dos oligoelementos séricos no modelo animal 3xTg-AD, assim como avaliação comportamental e imunohitoquímica. **Métodos:** Inicialmente, foi avaliada a influência do período do dia (matutino e vespertino) e do sexo do animal, nos parâmetros comportamentais em animais saudáveis, a fim de determinar a melhor condição experimental. Após essa etapa, a avaliação comportamental foi conduzida mensalmente ao longo de 12 meses em animais transgênicos 3xTg-AD, utilizando os testes do labirinto aquático de Morris (memória espacial), teste de reconhecimento de objeto novo (memória episódica) e locomoção espontânea em campo aberto (atividade locomotora). Paralelamente, os níveis de cobre, zinco e selênio foram mensurados em amostras de soro por ICP-MS. Para a detecção de peptídeos β-amiloides por imunohistoquímica, amostras de tecido cerebral foram coletadas e analisadas para a presença de placas beta-amiloides. **Resultados:** Os testes comportamentais revelaram déficits progressivos em memória espacial e episódica nos animais transgênicos, com alterações significativas observadas no labirinto aquático de Morris e no teste de reconhecimento de objeto novo. A atividade locomotora apresentou um padrão variável ao longo do tempo, com maior atividade inicial seguida de redução nos estágios mais avançados. A análise dos oligoelementos revelou padrões distintos de variação entre eles. O cobre apresentou aumento progressivo com maior significância nos meses iniciais e finais. O zinco, assim como o selênio apresentaram diminuição linear, sendo o selênio mais acentuado desde os primeiros meses. A análise imunohistoquímica mostrou que a deposição de beta-amiloide, tanto intracelular como em placas, aumentou progressivamente nos animais transgênicos, tornando-se acentuada a partir do 5º mês e atingindo o pico entre o 8º e 12º mês. **Conclusões:** Os oligoelementos mostraram-se biomarcadores promissores da

doença de Alzheimer, com alterações nos níveis de cobre, zinco e selênio desde o terceiro mês de vida do animal. Essas mudanças correlacionam-se com déficits comportamentais e acúmulo de β-amiloide, refletindo a progressão da doença. O estudo reforça a importância desses biomarcadores no diagnóstico e monitoramento do Alzheimer.

Descritores: Doença de Alzheimer; Espectometria de massa com plasma indutivamente acoplado ICP-MS; Biomarcadores; Oligoelementos; Comportamento animal

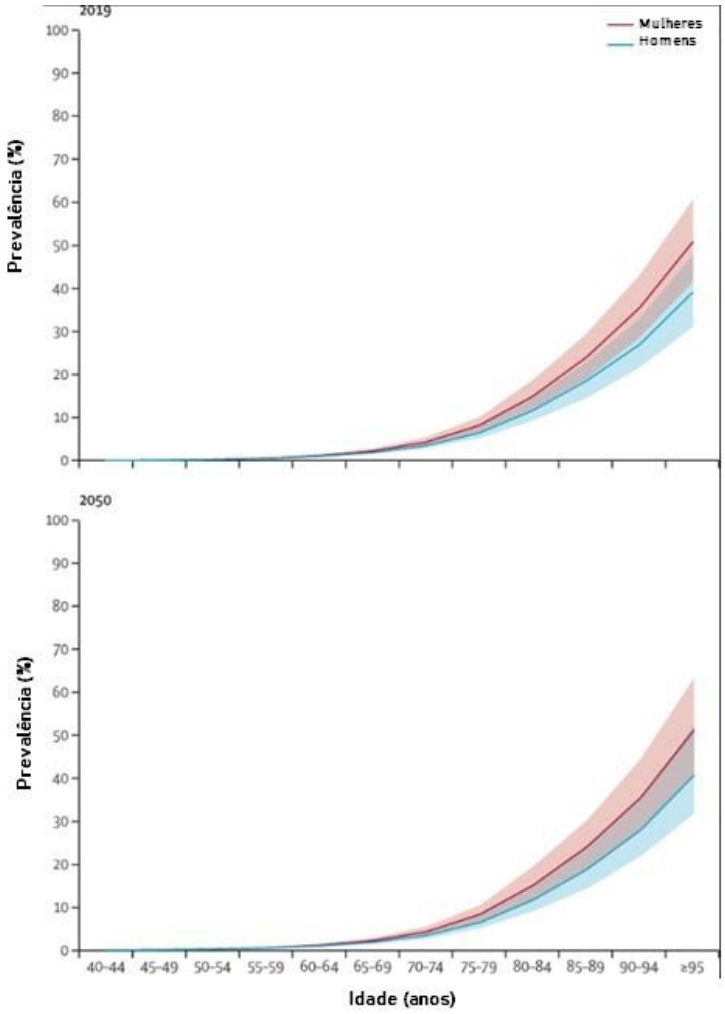
1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo, são abordadas as principais bases teóricas sobre a doença de Alzheimer (DA). Primeiramente, discute-se a epidemiologia da doença, destacando seu impacto global e o aumento de casos com o envelhecimento populacional. Em seguida, é explorada a fisiopatologia da DA, com foco nas placas beta amiloide (Aβ) e nos emaranhados neurofibrilares (NFTs - *neurofibrilary tangles*) de proteína tau, que causam degeneração neuronal. Os métodos de diagnóstico são discutidos, incluindo o uso de biomarcadores convencionais, como Aβ e tau, no líquido cefalorraquidiano (LCR). A detecção de oligoelementos como biomarcadores é apresentada como uma abordagem promissora, com a técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS - *inductively coupled plasma mass spectrometry*) sendo detalhada pela sua alta sensibilidade e precisão. Modelos pré-clínicos, como o 3xTg-AD, são discutidos por sua capacidade de replicar aspectos da doença humana. Finalmente, são descritas as avaliações comportamentais em animais, que permitem investigar déficits cognitivos, como memória e aprendizagem, com destaque para o teste do labirinto aquático de Morris (LAM) e o teste de reconhecimento de objeto (TRO).

1.1 Epidemiologia da doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva e a maior causa de demência em idosos no mundo.[1] Cerca de 70% dos casos são devido ao Alzheimer, seguido de doença cerebrovascular e degeneração frontotemporal, com médias de 15 e 10% respectivamente. Com o aumento da expectativa de vida, alta taxa de crescimento populacional e índice de envelhecimento, a incidência da DA tende a seguir o mesmo padrão de envelhecimento da população.[2,3]

Há uma expectativa de que em 2050, como ilustra a figura 1, cerca de 152 milhões de pessoas serão diagnosticadas com demência e atualmente, representa um problema de saúde global crescente que coloca um fardo significativo nas sociedades e nos sistemas de saúde, com um custo de quase um trilhão de dólares por ano (que deve dobrar até 2030).[4]



Fonte: Traduzido de GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet Public Health. 2022;7(2):e105-e25. Figure 1. Global prevalence of dementia (with 95% uncertainty intervals) by age group and sex in 2019 and 2050; p. e109.[4]
Figura 1. Prevalência global de demência por faixa etária e sexo em 2019 e 2050

Aproximadamente 5% dos pacientes DA são diagnosticados com DA familiar, uma forma precoce da doença associada a uma forte predisposição genética. Essa condição é caracterizada por mutações nos genes de proteína precursora amiloide (APP - *amyloid-beta precursor protein*) localizado no cromossomo 21, presenilina 1 (PSEN1), no cromossomo 14, e presenilina 2 (PSEN2), no cromossomo 1.[5,6] Seu diagnóstico ocorre entre os 40 e 50 anos de idade e sua principal característica é a hereditariedade.[5] Por ser uma patologia majoritariamente presente em idosos, a prevalência do diagnóstico da forma esporádica a partir dos 65 anos, é de aproximadamente 5%, aumentando significativamente para 30% aos 85 anos.[7]

Embora vários genes tenham sido relacionados à susceptibilidade à DA, o único fator genético consistentemente identificado para as formas precoce e tardia da doença é o genótipo da apolipoproteína E (APOE).[8] O alelo ε4 representa um fator de risco, enquanto o alelo ε2 funciona como um fator protetor.[9]

A descoberta de polimorfismos nos genes que codificam a APP e as enzimas responsáveis por transformar essa proteína em fragmentos amiloidogênicos forneceram evidências substanciais do papel crucial das placas amiloides no desenvolvimento da DA. Esses casos familiares têm sido fundamentais para a criação de modelos experimentais da doença.

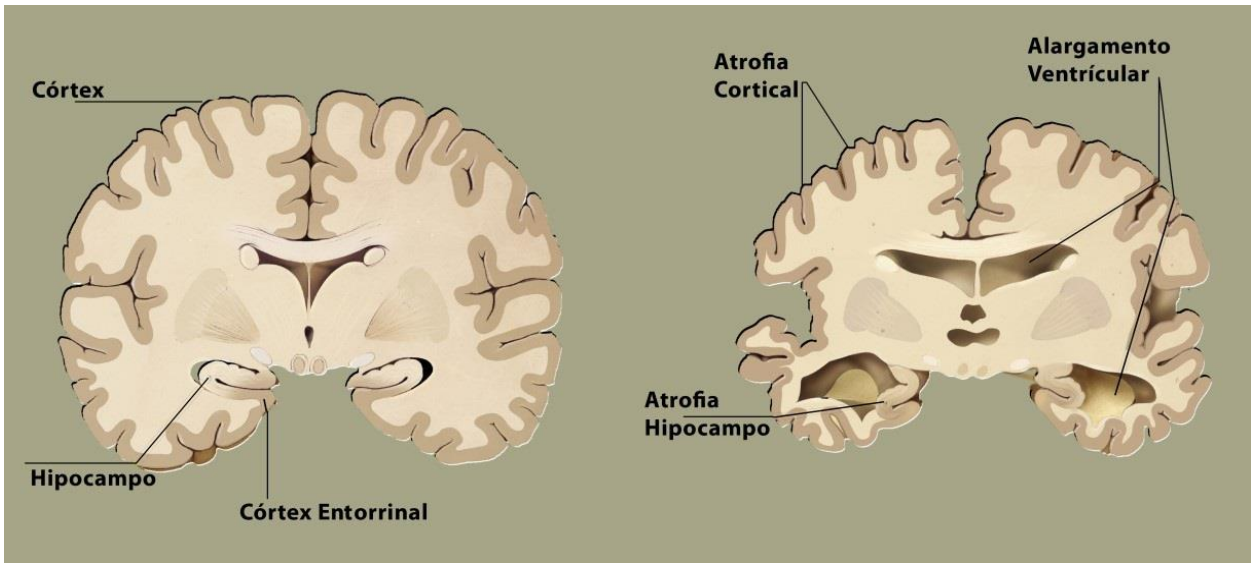
O comprometimento cognitivo progressivo característico da doença, leva ao declínio gradual das funções cognitivas, incluindo perda de memória, linguagem, e habilidades de resolução de problemas, o que eventualmente acarreta à perda de autonomia e à necessidade de cuidados contínuos.[3,9,10] Essa neuropatologia é dividida em estágios (Figura 2), sendo o início a fase pré-clínica antes do aparecimento dos sintomas, mas já com possíveis alterações no cérebro, seguido do comprometimento cognitivo leve (CCL), e então entrando nos estágios da demência em si, podendo progredir de leve para moderado e então severo, conforme mostra a figura 2.[3]



DA: doença de Alzheimer.
Fonte: Traduzido de 2024 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement. 2024;20(5):3708-821. FIGURE 1. Alzheimer's disease (AD) continuum. Although these arrows are of equal size, the components of the AD continuum are not equal in duration; p. 3713.[3]
Figura 2. Fases da doença de Alzheimer e agravamento dos sintomas

Alguns fatores ambientais podem favorecer o desenvolvimento da patologia e o agravamento dos sintomas, como o isolamento social e estresse intenso, estando associados a uma perda extensa de atividade sináptica, atrofia cerebral, afinamento cortical e aumento na região ventricular (Figura 3).[11,12] A atrofia se inicia com o afinamento do córtex na região do lobo temporal medial, seguido do hipocampo,

podendo ser vista antes mesmo do aparecimento dos sintomas, na fase pré-clínica da doença, por meio de exames de imagem.[13]



Fonte: Oliveira Junior PP. Medida da espessura cortical com imagens de ressonância magnética: técnica e aplicações na doença de Alzheimer e na polimicrogiria [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009. Figura 8 - Alterações morfológicas na Doença de Alzheimer (Modificado de Figura disponibilizada como domínio público); p. 34.[14]
Figura 3. Comparação entre cérebro saudável e acometido pela doença de Alzheimer

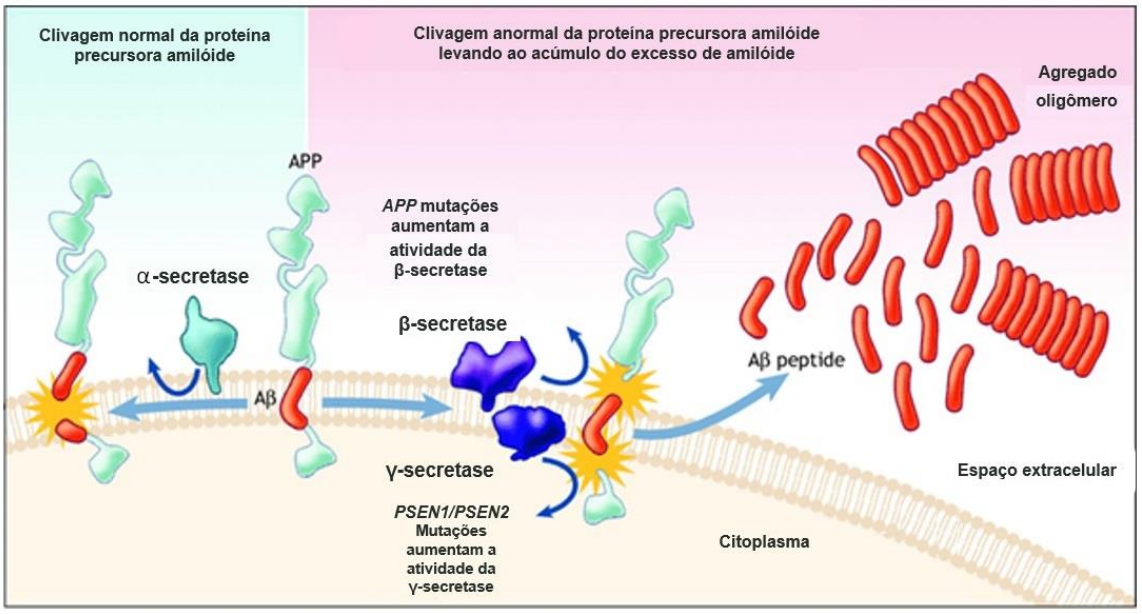
Embora algumas dessas alterações estejam associadas ao envelhecimento saudável, a junção de medidas clínicas e moleculares pode levar a um diagnóstico de Alzheimer.

1.2 Fisiopatologia da doença de Alzheimer

Os principais marcadores indicativos da DA incluem a formação de placas senis devido ao depósito extracelular de peptídeos Aβ e a formação de NFTs intracelular constituído pela proteína tau hiperfosforilada. Esses depósitos resultam em disfunção sináptica e morte neuronal, particularmente nas regiões do hipocampo e do córtex cerebral, áreas críticas para a memória e outras funções cognitivas.[6,15-18]

O peptídeo Aβ é um pequeno fragmento solúvel em água, normalmente presente em organismos saudáveis. Ele é gerado a partir da clivagem da APP, uma proteína transmembrana expressa em várias células, incluindo neurônios.[19-24] A clivagem proteolítica da APP pode ocorrer por diferentes enzimas secretases.

Quando a α-secretase realiza a clivagem no interior do domínio Aβ, o produto resultante não é amiloidogênico. No entanto, quando o processo enzimático é mediado pelas enzimas de clivagem β-secretase e γ-secretase, em situação saudável, a clivagem sequencial dessas enzimas resulta, principalmente, na formação de fragmentos de Aβ 40 (Aβ40). Na ocorrência de mutações nos genes da PSEN1 ou PSEN2, que são componentes do completo γ-secretase, ocorre a desestabilização da estrutura do peptídeo, e a quebra, principalmente, da isoforma Aβ 42 (Aβ42), gerando peptídeos insolúveis que tendem a se acumular formando oligômeros insolúveis, que por sua vez formam as placas no espaço extracelular como mostrado na figura 4.[24-27]



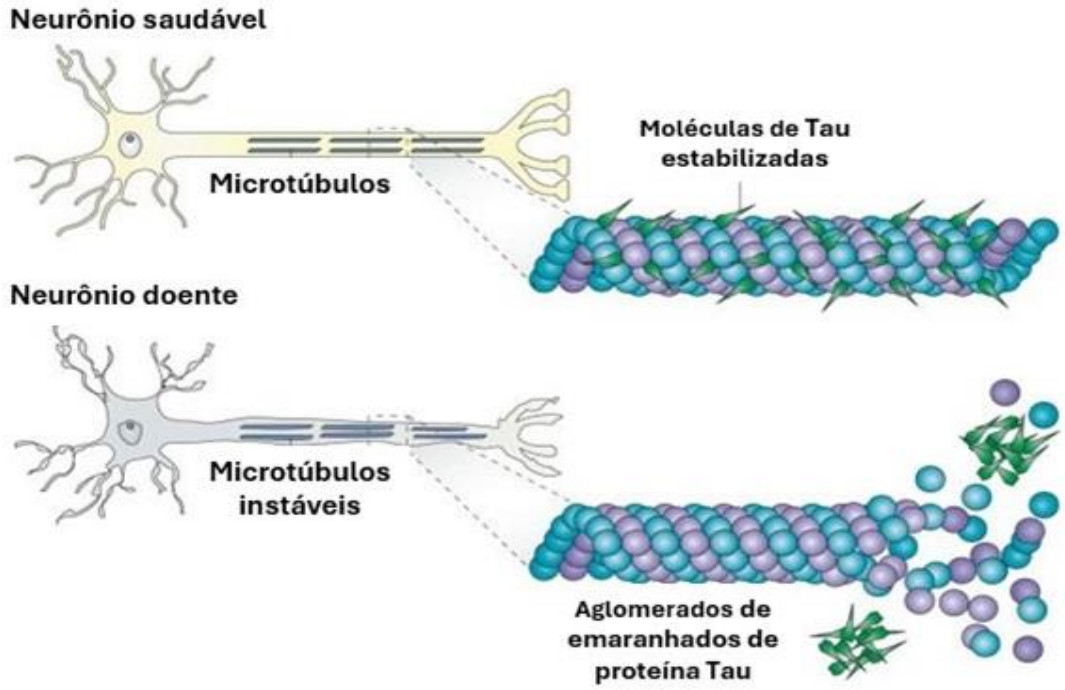
Aβ: beta amiloide; APP: proteína precursora amiloide; PSEN1: presenilina 1; PSEN2: presenilina 2.
Fonte: Traduzido de Patterson C, Feightner JW, Garcia A, Hsiung GY, MacKnight C, Sadovnick AD. Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. Cmaj. 2008;178(5):548-56. Figure 1: The amyloid precursor protein (APP) is a transmembrane protein that can undergo a series of proteolytic cleavage by secretase enzymes. Image by: Lianne Friesen and Nicholas Woolridge; p. 551.[25]
Figura 4. Mecanismos normal e irregular da clivagem da proteína precursora amiloide

Os oligômeros de Aβ, são citotóxicos para os neurônios, e podem interferir na função sináptica e morte neuronal. Além disso, liberam radiais de oxigênio (O_2) que também são tóxicos para as células.[28,29]

Por sua vez, os NFTs se originam da proteína tau que é encontrada no citoesqueleto dos neurônios e desempenham um papel crucial na neurodegeneração associada à doença. Essas proteínas se agregam ao corpo e dendritos dos neurônios,

comprometendo sua estrutura e função, resultando em neuroinflamação, falhas sinápticas e eventuais perdas neuronais e cognitivas.[30]

Isso acontece quando grupos fosfato se ligam às moléculas da proteína, diminuindo a ligação dessas aos microtúbulos, levando à sua despolimerização. As moléculas de tau hiperfosforilada soltas no meio extracelular se ligam entre si, formando pequenos aglomerados, que por sua vez se ligam, resultando nos emaranhados,[29] como ilustrado na figura 5. Isso provavelmente resulta tanto da hiperfosforilação da tau, que reduz a ligação da proteína aos microtúbulos, quanto do sequestro dela hiperfosforilada nos emaranhados, que reduz a quantidade de tau disponível para ligar os microtúbulos. A perda de sua função leva à instabilidade dos microtúbulos e à redução do transporte axonal, o que poderia contribuir para a neuropatologia.[31]



Em neurônios saudáveis a proteína tau constitui os microtúbulos dando estabilidade.
Fonte: Traduzido e adaptado de Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(10):783-93. Figure 2: Tau in healthy neurons and in tauopathies; p. 785.[31]
Figura 5. Processo de desestabilização dos microtúbulos neurais

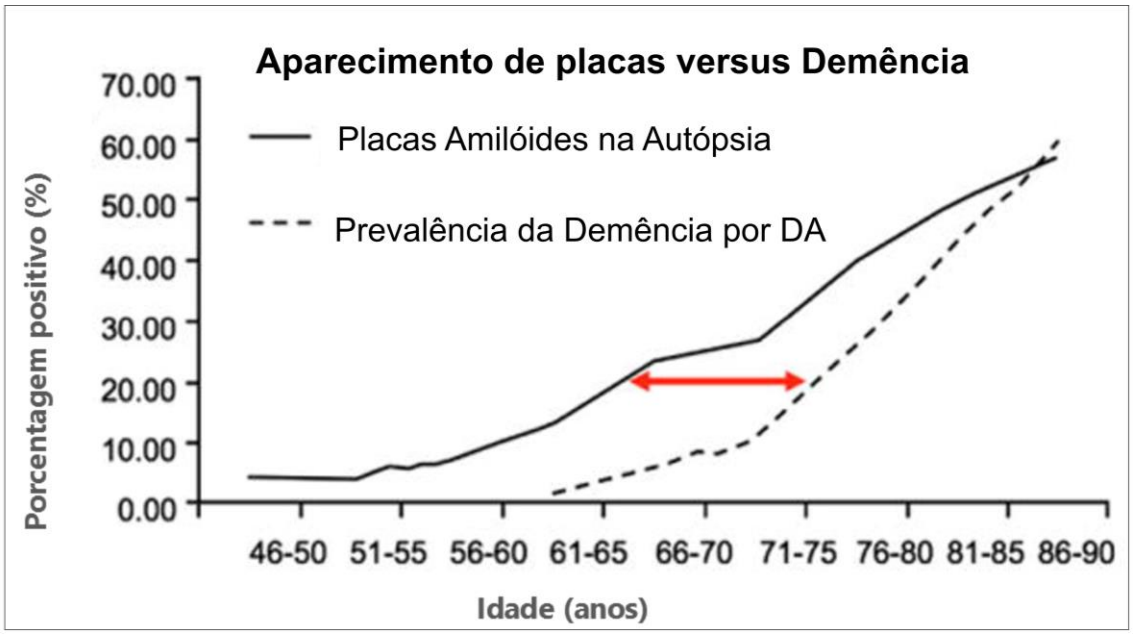
Na DA, a proteína tau recebe um número excessivo de grupos fostato, processo chamado de hiperfosforilação. Isso faz com que a proteína altere sua conformação e resulta no desprendimento da proteína dos microtúbulos, se agregando

em formato de fibras no citoplasma do neurônio. Uma vez que tais proteínas hiperfosforiladas se desprendem, os microtúbulos ficam instáveis e perdem sua conformação, impactando diretamente no transporte axonal, causando perdas sinápticas e por consequência uma disfunção neuronal.[32] Conforme o aumento dessas fibras ocorre, elas se agregam entre si formando os emaranhados, que causam também uma resposta inflamatória no cérebro, por meio de ativação de células da glia e astrócitos, que por sua vez liberam citocinas pró-inflamatórias, acelerando ainda mais a neurodegeneração.[11,20,31]

Tanto a agregação da tau quanto a de Aβ contribui para a patologia da DA, mas as hipóteses diferem sobre qual deles é o principal fator causador.[33] No entanto, ambos são elementos da DA utilizadas para sua confirmação *post mortem*.[27]

1.3 Métodos de diagnóstico e detecção da doença de Alzheimer

O diagnóstico da DA pode ser desafiador, pois os sintomas clínicos frequentemente demoram até uma década para se manifestar, a partir do início da deposição de Aβ no cérebro, como ilustrado na figura 6. O que sugere que as alterações patológicas associadas à DA começam muito antes do aparecimento dos sinais cognitivos visíveis. A figura 6 evidencia essa progressão temporal, reforçando a importância de métodos diagnósticos que detectem a patologia subjacente antes do surgimento dos sintomas clínicos.[34,35]



DA: doença de Alzheimer.
Fonte: Traduzido de Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):280-92. Figure 4. Postulated temporal lag of approximately a decade between the deposition of Aβ (% of individuals with amyloid plaques in a large autopsy series) and the clinical syndrome of AD dementia (estimated prevalence from three epidemiological studies). Figure courtesy of Mark Mintun and John Morris, Washington University; p. 286.[34]
Figura 6. Aparecimento das placas Aβ *versus* a progressão da demência da doença de Alzheimer

Tradicionalmente, o diagnóstico de demência é baseado no padrão de déficits cognitivos, complementado por parâmetros adicionais avaliados por meio de investigações clínicas.[36] Essas investigações incluem exames de sangue e imagens estruturais do cérebro, como tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), que ajudam a descartar causas não degenerativas dos sintomas.[36,37]

A RM é uma das principais ferramentas de imagem para a detecção e acompanhamento da DA, permitindo uma avaliação detalhada das alterações estruturais no cérebro associadas à neurodegeneração. A RM estrutural é amplamente utilizada para medir a morfometria cerebral, com destaque para a análise volumétrica do hipocampo, região cerebral crítica envolvida na memória e uma das primeiras a ser afetada pela DA. A atrofia do hipocampo observada na RM é um biomarcador importante e frequentemente, utilizado para a detecção precoce da doença, antes mesmo que os sintomas clínicos evidentes apareçam.[38,39]

Além da volumetria do hipocampo, a RM estrutural também permite identificar atrofia generalizada do córtex cerebral, o que é indicativo de progressão da

DA. Essa técnica de imagem possibilita a quantificação dessas alterações de forma precisa, permitindo que os médicos acompanhem a evolução da neurodegeneração ao longo do tempo.[38]

No entanto, a RM estrutural, por si só, tem suas limitações no diagnóstico diferencial da DA, especialmente em estágios muito iniciais, onde as alterações estruturais podem ser sutis. Por isso, o uso combinado de técnicas como o tomografia por emissão de pósitrons (PET - *positron emission tomography*) e biomarcadores no LCR (por exemplo, Aβ e tau) é frequentemente recomendado para aumentar a acurácia do diagnóstico.[40] Técnicas de RM funcional e por imagem de difusão, também têm sido exploradas para avaliar alterações na conectividade funcional cerebral, contribuindo para uma compreensão mais abrangente dos efeitos da DA nas redes neurais.[13,37] Essas técnicas têm ajudado a mapear o impacto da DA na conectividade cerebral, associando os achados morfológicos da RM estrutural às mudanças funcionais e metabólicas vistas em outras modalidades de imagem, fornecendo um panorama mais completo da progressão da doença.

A PET é amplamente utilizada para medir alterações metabólicas no cérebro de pacientes com suspeita de DA e pode ser realizada com diferentes marcadores radioativos. A PET com fluordeoxiglicose marcada com flúor-18 (^{18}F-FDG-PET) tem sido descrito como uma técnica superior à RM estrutural para o diagnóstico precoce da DA. Estudos mostram que a ^{18}F-FDG-PET é capaz de detectar a neurodegeneração por meio da redução do metabolismo da glicose no cérebro, que está diretamente relacionada ao declínio cognitivo observado em pacientes com DA,[13,41] essa redução é um marcador confiável da doença, pois ocorre antes do aparecimento dos sintomas clínicos evidentes.[38,41]

Embora haja diminuição no metabolismo da glicose durante o envelhecimento normal, o declínio é significativamente maior nos indivíduos afetados pela DA, tornando a ^{18}F-FDG-PET uma ferramenta eficaz para detecção precoce da neurodegeneração. Além disso, a tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose (PET-FDG - *positron emission tomography using fluorodeoxyglucose*) tem sido amplamente utilizado para diferenciar DA de outras formas de demência, apresentando alta sensibilidade para identificar as regiões do cérebro com hipometabolismo, como o córtex temporoparietal.[42] Embora a PET-FDG seja uma técnica superior para a detecção precoce, seu custo elevado e a necessidade de injeção de traçadores radiomarcados limitam sua disponibilidade.[38]

Por outro lado, a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT - *single-photon emission computerized tomography*) avalia o fluxo sanguíneo cerebral e pode ajudar a identificar padrões de fluxo sanguíneo anormal associado ao Alzheimer. Atualmente, SPECT é uma das técnicas de imagem mais amplamente disponíveis para o estudo da função cerebral e a evolução das técnicas nucleares, em direção à imagem molecular, permitiu a detecção *in vivo* de fenômenos característicos de doenças neurodegenerativas, como depósitos de Aβ ou agregados de tau encontrados na DA, ou até distúrbios da função dopaminérgica, utilizando traçadores específicos. Embora possa haver uma ligeira vantagem em favor da PET em termos de sensibilidade, o desempenho diagnóstico do SPECT e da PET na DA é bastante semelhante.[43] O Aβ42 no LCR e a PET de amiloide podem ser usados de forma intercambiável na clínica, a escolha pode ser baseada na disponibilidade, custos e estimativas de risco (exposição à radiação vs. cefaleia após punção lombar), juntamente com as preferências do médico e do paciente.[44]

1.4 Biomarcadores convencionais

O diagnóstico de DA, especialmente nos estágios prodrômicos (quando as alterações neuropatológicas já estão presentes, mas os sintomas ainda são leves) é desafiador, sobretudo em casos com apresentações clínicas atípicas. O diagnóstico diferencial entre a DA, a degeneração do lóbulo dorsolateral frontotemporal e as síndromes parkinsonianas neurodegenerativas é particularmente complexo devido à sobreposição de sintomas. Nesse contexto, o uso de neuroimagem, como a PET, tem se mostrado uma ferramenta poderosa na detecção precoce da DA, em complemento aos biomarcadores tradicionais.[45,46]

Os biomarcadores no LCR, como a razão Aβ42, Aβ40, proteína tau total (t-tau – *total tau*) e tau fosforilado (p-tau - *phosphorylated tau*), são fundamentais para o diagnóstico da patologia da DA e são amplamente reconhecidos nas diretrizes internacionais.[44] Esses biomarcadores são utilizados para detectar a presença de placas Aβ e NFTs, ambos os processos patológicos-chave na DA. Em vários países europeus, a análise do LCR já é parte do diagnóstico clínico, regulamentada de acordo com diretrizes específicas.[47,48]

Apesar de medirem processos patológicos semelhantes, os biomarcadores do LCR e da PET possuem características distintas. O LCR, por exemplo, é menos invasivo e mais acessível, tornando-se uma opção inicial mais prática e econômica. Em contrapartida, a tomografia por emissão de pósitrons com marcador beta amiloide (PET-amiloide - *positron emission tomography for amyloid imaging*) oferece uma visualização direta da deposição de Aβ no cérebro, sendo especialmente útil em casos em que a amostragem do LCR não é possível ou quando os resultados são inconclusivos. A escolha do biomarcador adequado deve, portanto, considerar o nível de experiência, padronização e disponibilidade em cada centro. O LCR pode ser utilizado como abordagem inicial, reservando a PET amiloide para casos específicos.[49]

A isoforma 42 da Aβ é o componente principal das placas Aβ e contribui para a angiopatia amiloide cerebral na DA. Aβ42 é um produto de clivagem de APP e é liberado dos neurônios quando essa proteína é clivada por β e γ-secretases em vesículas sinápticas. A APP é metabolizada por muitos tipos de células, mas a secreção de Aβ42 tem a maior ocorrência nos neurônios. Sua secreção neuronal também parece depender da atividade sináptica.[9] A concentração de Aβ42 pode ser medida no LCR por técnicas baseadas em anticorpos, como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*), bem como por técnicas independentes de anticorpos, como espectrometria de massa.[50,51]

Amostras de sangue são mais facilmente obtidos e de forma menos invasiva quando comparados com o LCR, e por isso encontrar marcadores nesse meio é algo de grande valor e necessidade. Alguns fatores a serem consideradas são a existência da barreira hematoencefálica e a baixa concentração no sangue de produtos alvo derivados do cérebro, que representam uma dificuldade em encontrar marcadores confiáveis para detecção em sangue para o Alzheimer pré-clínico.[52]

A análise da concentração plasmática de Aβ é um biomarcador promissor para detectar deposição de Aβ cerebral associada à DA. No entanto, os resultados dos estudos sobre a relação entre Aβ plasmático e a DA têm sido inconsistentes. Enquanto alguns estudos encontraram níveis limitados de Aβ plasmático, especialmente Aβ42 e a razão Aβ42/Aβ40, em pacientes com demência ou CCL, outros relatam associações opostas.[53,54] O desafio aumenta quando se tenta estudar Aβ plasmático em indivíduos cognitivamente saudáveis, devido à faixa limítrofe dos níveis de Aβ. Avanços em técnicas de detecção, como a imunoensaio de matriz molecular única, e a imunoprecipitação por espectrometria de massa, têm melhorado esses

resultados, mostrando que a razão Aβ42/Aβ40 no plasma está associada à amiloidose cerebral, especialmente quando combinado com idade avançada. Essas técnicas podem identificar a amiloidose com alta precisão e sugerem que o Aβ plasmático pode ser útil como ferramenta de rastreamento, especialmente para indivíduos com sinais de CCL.[53]

No entanto, a implementação dessas tecnologias enfrenta desafios devido à complexidade e aos requisitos técnicos. Com exceção de Aβ42, várias outras espécies de Aβ estão presentes no LCR humano, sendo Aβ40 a mais abundante, encontrada em concentrações cerca de 10 vezes maiores que Aβ42. Embora o Aβ40 do LCR não mostre nenhuma alteração ou uma alteração menor na DA, essa razão do LCR tem desempenho superior para identificar DA do que o Aβ42 do LCR como um único biomarcador.[44,54,55]

A primeira sonda química para PET amiloide derivado do corante fluorescente histológico de ligação às placas Aβ, o tioflavina-T (ThT), que fica retida em regiões corticais do cérebro de pacientes com DA em comparação com controles saudáveis, com retenção no cerebelo usada como região de referência.[56]

Neurônios contendo emaranhados liberam tau fosforilada, que pode ser medida por ELISA, usando combinações de anticorpos que reconhecem especificamente epítopos de fosfo-tau. Pacientes com DA têm concentrações aumentadas de p-tau em seu LCR, no entanto, essa concentração se correlaciona fracamente com a patologia do emaranhado neurofibrilar no cérebro.[50,52] O aumento das concentrações de proteína tau no LCR tem sido associado à DA. As proteínas tau podem ser classificadas como p-tau, que se refere às formas hiperfosforiladas da proteína tau, e t-tau, que engloba diversos isômeros da proteína tau. Estudos mostraram uma correlação entre os níveis de p-tau no LCR e a formação de NFTs no cérebro. Por outro lado, as concentrações de t-tau no LCR refletem a gravidade da neurodegeneração e os danos neuronais ou axonais em pacientes com DA. No entanto, os níveis de t-tau, também podem variar em distúrbios agudos, como acidente vascular cerebral e traumatismo cranioencefálico, além de condições neurodegenerativas crônicas, como a doença de Creutzfeldt-Jakob. Por isso, a t-tau é menos específica para a DA e mais indicativa de degeneração e desregulação cerebral geral. Apesar de as proteínas tau não serem biomarcadores específicos da DA, a combinação de biomarcadores específicos e não específicos da doença tem se mostrado eficaz no diagnóstico. Por exemplo, um estudo comparando as concentrações de proteínas tau e Aβ revelou que a

razão entre tau (t-tau ou p-tau) e Aβ no LCR é útil para detectar a patologia da DA em estágios iniciais.[27,31]

1.5 Oligoelementos como biomarcadores da doença de Alzheimer

Os oligoelementos, também conhecidos como microminerais, são metais essenciais para o funcionamento do organismo, mesmo em quantidades muito pequenas. Esses elementos desempenham papéis fundamentais em processos bioquímicos críticos, atuando como cofatores em reações enzimáticas, facilitando a regulação do metabolismo, e participando do transporte de O_2 e da defesa antioxidante. Exemplos de oligoelementos incluem o ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), selênio (Se) e manganês (Mn), entre outros, cada um com uma função única e indispensável na biologia celular.[57,58]

Os oligoelementos não são apenas necessários para a manutenção das funções normais das células, mas também desempenham papéis críticos em situações de estresse oxidativo e resposta inflamatória, particularmente no sistema nervoso. Eles influenciam a atividade de enzimas antioxidantes, como a glutationa (GSH) peroxidase, que depende do Se para neutralizar radicais livres que danificam células e tecidos. Ao mesmo tempo, os oligoelementos também participam de processos como a formação de proteínas estruturais e neurotransmissores, que são essenciais para a comunicação entre os neurônios.[59]

O alumínio (Al) é um dos metais mais utilizados em indústrias de alimentos processados, cosméticos e medicamentos. No corpo, o Al está ligado à transferrina plasmática e às moléculas de citrato que podem mediar a transferência dele para o cérebro. Estudos mostraram que o Al se acumula nas áreas do córtex, hipocampo e cerebelo, onde interage com proteínas e causa agregação e fosforilação de proteínas altamente fosforiladas como a proteína tau, característica da DA.[60,61] O chumbo (Pb) compete com o local de ligação de biometais como o cálcio (Ca) e pode atravessar rapidamente a barreira hematoencefálica, podendo causar danos graves.[20]

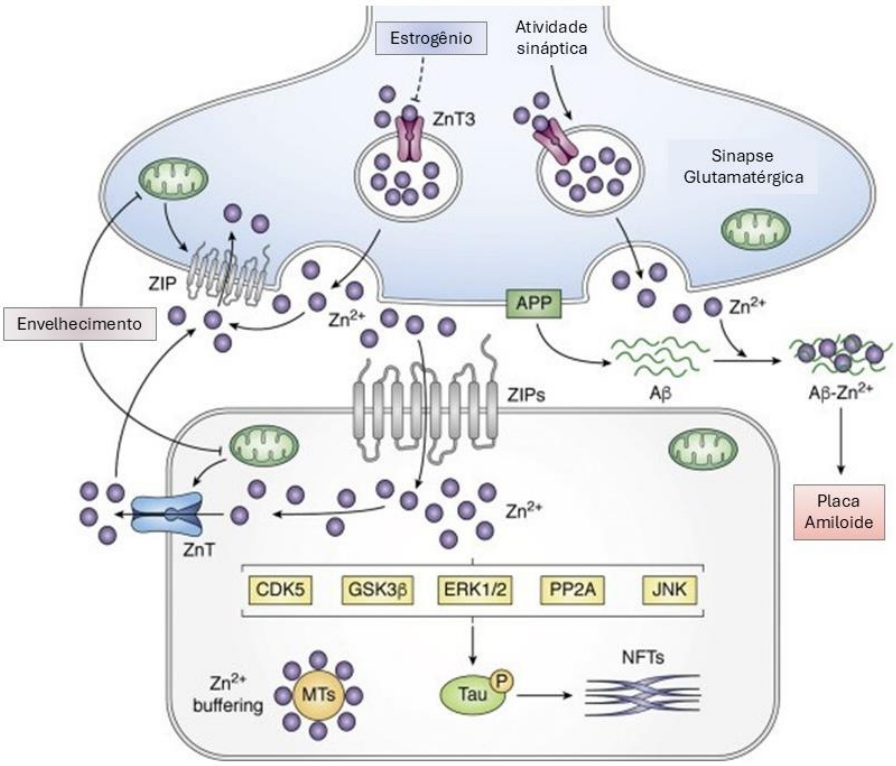
Estudos prévios indicam que certos oligoelementos surgem ao lado do acúmulo de tau/Aβ, sugerindo que existem correlações espaciais entre tau/Aβ e certos elementos. Os oligoelementos essenciais têm papéis fisiológicos fundamentais em, por exemplo, reações enzimáticas, transporte de O_2 e sinalização celular. Sua

homeostase é, portanto, crucial para o bom funcionamento do cérebro.[28,30,62] O Cu possui papel fundamental na agregação de Aβ, resultado da modificação de três resíduos de histidina,[61] o Fe catalisa a agregação da proteína Aβ, pela formação de espécies reativas, devido ao seu estado férrico[63,64] e o Zn pode atuar na modulação da APP, levando a uma deposição ainda maior de Aβ.[32,63,65,66] Além disso, níveis elevados de Cu, Fe e Zn são encontrados em placas Aβ em tecidos cerebrais com DA,[67-69] sugerindo um envolvimento direto ou indireto de oligoelementos na patogênese da DA.

A homeostase neuronal do Zn está desregulada na DA. Esse elemento está presente principalmente no hipocampo, amígdala e neocortéx do cérebro,[70] se encontra em vesículas glutamatérgicas, resultando em altas concentrações de Zn^{2+} nas fendas sinápticas.[19,71] O alto fluxo de Zn na sinapse contribui para a plasticidade sináptica, e a potenciação de longa duração (PLD) na região cornu ammonis 3 (CA3) do hipocampo que é modulada pelo Zn em alvos pré e pós-sinápticos.[32] Ele entra no citoplasma neuronal através de proteínas transportadoras reguladas por Zn ou Fe (ZIPs - z*inc regulated transporter-like Iron regulated transporter-like protein*), enquanto o efluxo citoplasmático é regulado pela proteína transportadora de Zn (ZnT - *zinc transporter*). Existem muitos tipos de ZIP e ZnT expressos em neurônios, mas o ZnT3 está envolvido na perda cognitiva com o envelhecimento e na formação de Aβ na DA. O ZnT3 concentra o Zn nas vesículas glutamatérgicas, que é liberado após a atividade sináptica e, em seguida, rapidamente absorvido. Durante o envelhecimento, a energia mitocondrial diminui, levando a uma recaptação mais lenta de Zn extracelular, que se liga ao Aβ e induz sua agregação, ficando preso na amiloide, conforme mostra a figura 7.[32] Ele também pode levar à toxicidade, já que o Zn também pode se ligar diretamente à proteína Tau para promover neurotoxicidade independente da hiperfosforilação.[72]

Adicionalmente, o Se exerce papéis importantes na regulação da atividade neuronal nas sinapses e são fundamentais para várias atividades enzimáticas, funções mitocondriais, neurotransmissão, aprendizagem e processos de memória.[73] No entanto, concentrações alteradas deste oligoelemento, principalmente na DA, estimula a produção de radicais livres que reagem com proteínas, DNA e lipídios, acelerando o processo de agregação da proteína Aβ,[74] que somado ao estresse oxidativo pode desencadear distúrbios neurodegenerativos.[74,75] Outros estudos indicam a possível mudança na concentração de outros oligoelementos como magnésio (Mg), Ca, Mn, Fe,

cobalto (Co), níquel (Ni), Cu, Zn, Se, mercúrio (Hg) e Pb e que estão relacionados com a DA.[73,76-78]

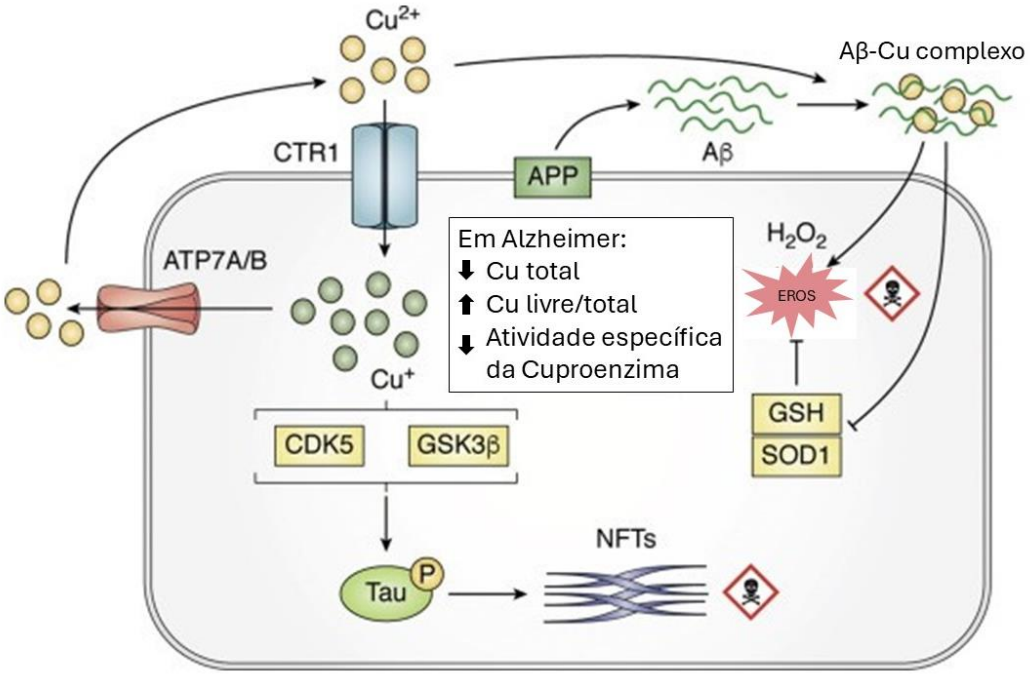


ZnT: proteína transportadora de zinco; ZnT3: proteína transportadora de zinco 3; ZIP: proteína transortadora regulada por zinco, regulada por ferro; Zn^{2+}: zinco; APP: proteína precursora amiloide; CDK5: quinase dependente de ciclina 5; GSK3β: glicogênio sintase quinase 3β; ERK1/2: proteínas quinases extracelular reguladas por sinal 1 e 2; PP2A: proteína fosfatase 2; JNK: quinase c-Jun N-terminal; NFTs: emaranhados neurofibrilares.
Fonte: Traduzido de Lei P, Ayton S, Bush AI. The essential elements of Alzheimer's disease. J Biol Chem. 2021;296:100105. Figure 1. Neuronal zinc homeostasis is dysregulated in Alzheimer's disease; p. 4.[32]
Figura 7. Desregulação da homeostase do zinco na doença de Alzheimer

O Cu, quando presente em altas concentrações, desempenha um papel semelhante ao Fe na indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no tecido cerebral, contribuindo para o processo de neurodegeneração.[73] Esse metal é absorvido pelos neurônios por meio de proteínas transportadoras, como a proteína de captação de Cu de alta afinidade 1 (CTR1 - *high affinity copper uptake protein 1*), e exportado por ATP7A e ATP7B. Nos pacientes com DA, os oligômeros de Aβ podem sequestrar o Cu extracelular e incorporá-lo à membrana neuronal, formando um complexo catalítico que gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse fenômeno contribui para uma redistribuição anômala do Cu no tecido cerebral, tornando-o deficiente dentro das células, mas aprisionado nas placas extracelulares, o que pode favorecer a

hiperfosforilação da proteína tau por meio da ativação das quinases dependente de ciclina 5 (CDK5) e glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3β).

A deficiência de Cu intracelular estimula a produção de Aβ, enquanto o excesso de Cu^{2+} extracelular pode induzir a agregação e precipitação de Aβ sob condições ácidas, promovendo reticulação e modificação oxidativa conforme mostra a figura 8.[32] Paralelamente, na DA, ocorre um aumento dos níveis de Cu no soro devido à disfunção no seu transporte, resultando em uma maior fração de Cu livre (não ligado à ceruloplasmina), que é altamente reativa e potencialmente tóxica. Mutações no gene ATP7B comprometem a homeostase do Cu, favorecendo sua acumulação na circulação sanguínea. Além disso, processos inflamatórios sistêmicos podem alterar a redistribuição do metal entre os tecidos, exacerbando esse desequilíbrio. Esse Cu livre pode atravessar a barreira hematoencefálica, intensificando o estresse oxidativo e promovendo a agregação do Aβ, contribuindo para a progressão da neurodegeneração.[79,80]



Cu^{+}: cobre; Aβ: beta amiloide; CTR1: proteína de captação de cobre de alta afinidade 1; APP: proteína precursora amiloide; ATP7A/B: ATPase de transporte alfa/beta; EROS: espécies reativas de oxigênio; CDK5: quinase dependente de ciclina 5; GSK3β: glicogênio sintase quinase 3 beta; GSH: glutationa; SOD1: superóxido dismutase 1; NFTs: emaranhados neurofibrilares.
Fonte: Traduzido de Lei P, Ayton S, Bush AI. The essential elements of Alzheimer's disease. J Biol Chem. 2021;296:100105. Figure 3. Copper dysregulation in Alzheimer's disease; p. 6.[32]
Figura 8. Desregulação da homeostase do cobre na doença de Alzheimer

1.6 Detecção dos oligoelementos mediante técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a detecção de oligoelementos (elementos químicos presentes em quantidades muito pequenas no organismo) como potenciais biomarcadores da DA em diferentes tipos de amostras biológicas, incluindo LCR e tecidos cerebrais de indivíduos autopsiados. Entre as técnicas destacam-se a microssonda de raios X de dispersão de energia, espectrofotometria de absorção atômica sem chama,[81] análise instrumental de ativação de nêutrons,[82] microssonda eletrônica,[17] microssonda de íons, análise de massa de microssonda de lasers,[83] espectrometria de massa de ionização secundária, entre outros.[52] No entanto, muitas dessas técnicas têm limitações em termos de sensibilidade e reprodutibilidade, o que dificulta a detecção consistente desses oligoelementos em concentrações extremamente baixas. Nesse contexto, a ICP-MS surge como uma

técnica poderosa e altamente sensível para a análise multielementar de uma ampla variedade de materiais, como tecido cerebral, LCR e sangue. A ICP-MS é amplamente reconhecida por sua alta sensibilidade, precisão quantitativa e capacidade de detectar múltiplos elementos simultaneamente, o que a torna uma ferramenta preferida para a análise de oligoelementos em estudos sobre a DA, permitindo a obtenção de dados consistentes e reprodutíveis.[84,85]

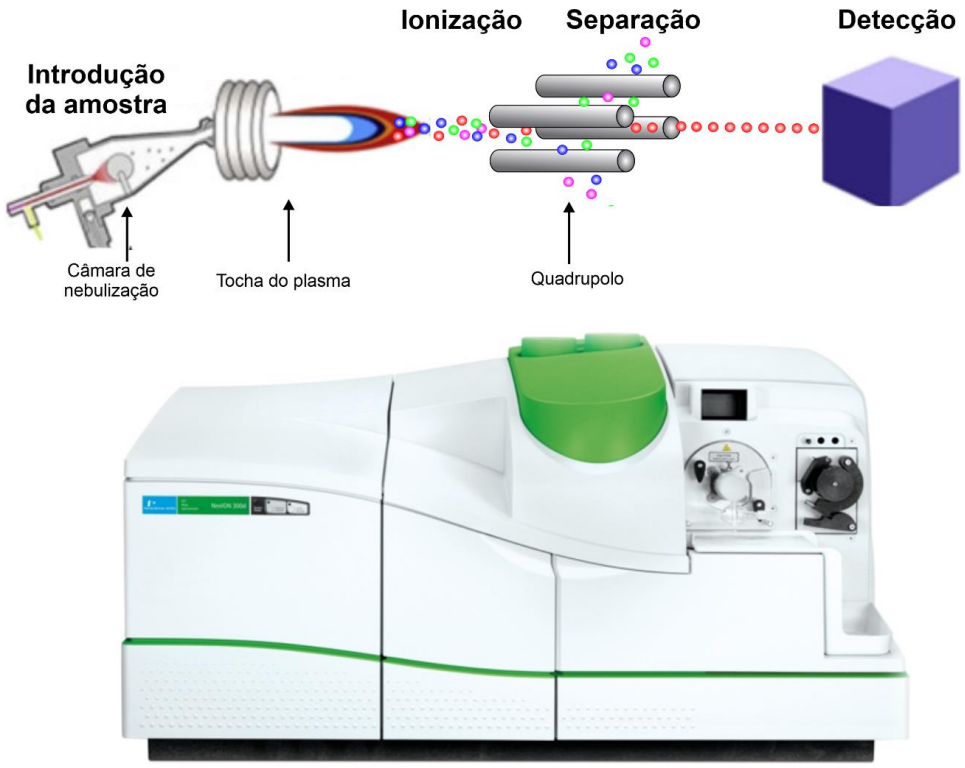
Essa técnica tem sido fundamental para a análise de traços de metais, que podem estar envolvidos em processos neurodegenerativos, facilitando a compreensão de como oligoelementos como o Fe, Cu e Zn podem influenciar o desenvolvimento e a progressão da DA. Além disso, a ICP-MS permite a detecção precisa de níveis elementares baixos, muitas vezes não alcançáveis por outras técnicas convencionais.[86,87]

Assim, a ICP-MS é considerada uma técnica extremamente poderosa e quantitativa, ideal para a análise multielementar de diversos tipos de materiais, como tecidos cerebrais, LCR e sangue. Sua capacidade de detectar simultaneamente diferentes elementos, com alta sensibilidade e precisão, torna-a indispensável para estudos que requerem a análise detalhada de oligoelementos, especialmente em amostras biológicas relacionadas a pesquisas de doenças como o Alzheimer.[63,88,89]

1.7 Princípio de funcionamento pela técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado para a deteção dos oligoelementos

A ICP-MS é uma técnica amplamente utilizada para a análise de oligoelementos em diversas amostras, oferecendo sensibilidade e precisão elevadas. Seu princípio envolve processos que garantem a identificação precisa de elementos em concentrações muito baixas, chegando a partes por trilhão (ppt). Apresenta alta reprodutibilidade com a tecnologia multi-quadripolar, sensibilidade aprimorada e alta resolução espectral para a detecção de isótopos multielementares.[90] Essa técnica tem se destacado em ciências da vida, sendo amplamente utilizada na detecção de heteroelementos e na quantificação precisa,[91,92] com aplicação em contextos clínicos, ambientais e industriais.[93] O processo de detecção segue quatro etapas principais, como mostrado na figura 9 e explicado de forma resumida nos subitens: nebulização e

introdução da amostra, ionização do plasma de argônio, separação dos íons por massa/carga (m/z) e detecção/quantificação.



A amostra é introduzida no equipamento e passa primeiramente pela câmara de nebulização, seguindo pela tocha do plasma. Ocorre a ionização dos elementos que são separados no quadrupolo, e então há a detecção e quantificação dos elementos selecionados. ICP-MS: Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.
Figura 9. Representação do mecanismo de detecção da ICP-MS

1.7.1 Nebulização e introdução da amostra

Inicialmente, a amostra é preparada e convertida em uma solução líquida, que é introduzida no sistema por meio de um nebulizador. Esse dispositivo converte a solução em névoa fina, composta por pequenas gotículas. A câmara *spray* é essencial, pois esse processo de nebulização remove gotículas maiores, que podem não vaporizar de maneira adequada, afetando a precisão da detecção dos oligoelementos presentes. Assim, com a nebulização, somente as gotículas menores e uniformes são encaminhadas ao plasma.[85]

1.7.2 Ionização no plasma de argônio

As gotículas finas são então transportadas para o plasma de argônio, uma região onde a temperatura é extremamente alta, ultrapassando os 7.000 °C. Nessa fase, ocorre a atomização das gotículas, e seus átomos são transformados em íons positivos. O plasma de argônio, criado através de correntes de radiofrequência, é ideal para este processo devido à sua inércia química e à sua capacidade de manter o ambiente estável para a ionização de vários elementos. A alta temperatura do plasma é responsável pela eficiente vaporização e ionização dos átomos, que são convertidos em íons prontos para análise.[85,94]

1.7.3 Separação dos íons por massa/carga

Após a ionização, os íons são direcionados para o analisador de massas, geralmente um quadrupolo ou analisador de tempo de voo (TOF - *time-of-flight*). Esses sistemas operam com base na razão m/z dos íons, separando-os de acordo com suas características. O quadrupolo, por exemplo, cria campos eletromagnéticos que permitem a passagem seletiva de íons com uma m/z específica, enquanto outros são descartados. Esse processo de filtragem permite que apenas os íons de interesse sejam detectados, tornando a técnica extremamente eficaz para a análise multielementar. A separação por m/z garante uma análise detalhada e precisa, permitindo a detecção simultânea de múltiplos elementos, desde aqueles com baixíssimas concentrações até os mais abundantes.[85,94]

1.7.4 Detecção e quantificação

Por fim, os íons selecionados atingem o detector de íons, geralmente um multiplicador de elétrons, que amplifica o sinal gerado pelos íons. O detector converte o número de íons em um sinal elétrico proporcional à quantidade de cada elemento presente na amostra. O uso de multiplicadores de elétrons permite a amplificação do sinal gerado pelos íons, mesmo em níveis de concentração muito baixos, como partes por bilhão ppb ou ppt. O *software* do espectrômetro de massa processa esses sinais e

gera dados quantitativos extremamente precisos, permitindo a análise detalhada de oligoelementos presentes em uma ampla gama de amostras, como sangue, tecido cerebral e LCR.[85,95]

1.7.5 Cela de reação dinâmica

A técnica de espectrometria de massas está sujeita a interferências, assim como, a maioria das técnicas analíticas. Essas interferências podem comprometer a precisão, detectabilidade e quantificação dos analitos, e podem ser de duas naturezas, espectrais e não-espectrais. As não-espectrais podem ocorrer durante o processo de introdução das amostras, alterações na nebulização ou mesmo na ionização do plasma. Já as interferências espectrais ocorrem quando a razão de massa por carga m/z de dois ou mais íons é igual, pois não é possível diferenciar a fonte, por se tratar de uma propriedade física, e não química.[96] Para evitar essa interferência é necessário considerar a diferença de concentrações do elemento interferente e do analito a ser quantificado, assim como a abundância dos isótopos. É importante selecionar isótopos com razão m/z que não sobreponha a razão de outro isótopo.[97] A otimização da cela de reação dinâmica considera a vazão de gás com a qual é possível obter o menor sinal de fundo e a máxima intensidade para o íon do analito a ser quantificado.[98-100]

1.8 Modelos pré-clínicos para o estudo da doença de Alzheimer

Os modelos animais desempenham um papel crucial no estudo dos mecanismos fisiopatológicos da DA, permitindo a exploração de processos complexos que não podem ser diretamente estudados em humanos. Os modelos são classificados em três categorias principais: modelos espontâneos, modelos intervencionistas, e modelos geneticamente modificados, cada um com suas próprias vantagens e desvantagens para a pesquisa.[101]

1.8.1 Modelos espontâneos

Os modelos espontâneos são baseados em animais que, naturalmente, à medida que envelhecem, desenvolvem características neurodegenerativas semelhantes a DA. Um exemplo amplamente utilizado é o rato SAMP8, que, ao longo do envelhecimento, exibe acúmulo de placa Aβ, perda de memória e disfunção sináptica, imitando alguns dos aspectos fisiopatológicos observados em humanos. Esses modelos têm a vantagem de permitir o estudo de processos biológicos naturais relacionados ao envelhecimento, o que é relevante para entender como a idade influencia o desenvolvimento da DA. No entanto, uma limitação significativa é que esses modelos não reproduzem todas as características patológicas da DA humana, como a formação de NFTs, o que reduz sua aplicabilidade em estudos mais profundos sobre os mecanismos específicos da doença.[101-103]

1.8.2 Modelos intervencionistas

Os modelos intervencionistas para o estudo da DA são caracterizados pela indução de patologias semelhantes à DA por meio de agentes externos. Um exemplo comum é a injeção intracerebral de peptídeos Aβ, que simula a formação de placas Aβ observadas na DA humana.[104] Outro método amplamente utilizado é a administração de estreptozotocina, que provoca resistência à insulina cerebral e disfunções no metabolismo da glicose, mimetizando alterações metabólicas associadas à DA. A estreptozotocina provoca perda neuronal e déficits de memória, tornando esses modelos úteis para estudar o papel de fatores metabólicos na progressão da neurodegeneração.[105]

Esses modelos oferecem várias vantagens, como a capacidade de controlar com precisão as variáveis experimentais, o que resulta em alta reprodutibilidade dos resultados. Além disso, são valiosos para testar hipóteses específicas sobre os mecanismos da doença e na triagem de novas terapias. No entanto, uma limitação significativa desses modelos é que eles não reproduzem completamente todas as características da DA, como o acúmulo de NFTs, limitando sua aplicabilidade em estudos sobre essa patologia específica. Ademais, esses modelos não replicam as interações

genéticas e ambientais complexas observadas em humanos, restringindo sua relevância para a forma esporádica da DA.[106,107]

Assim, embora esses modelos sejam valiosos para explorar aspectos específicos da doença, como a resistência à insulina ou a inflamação cerebral, sua aplicabilidade geral é limitada pela ausência de certas características patológicas e pela falta de representatividade das interações genéticas envolvidas na DA humana.

1.8.3 Modelos geneticamente modificados

Ao longo dos últimos 20 anos, diversos modelos de DA foram desenvolvidos, incluindo camundongos transgênicos que superexpressam formas mutantes da APP humana, presenilinas e/ou a proteína tau no cérebro, fundamentais na pesquisa da DA, permitindo a introdução de mutações humanas associadas às formas hereditárias da doença. Esses modelos possibilitam a replicação de aspectos-chave da patologia, como o acúmulo de placas Aβ e o desenvolvimento de déficits cognitivos. Um exemplo amplamente utilizado é o camundongo APP/PSEN1, que, ao desenvolver placas de Aβ em idades jovens, facilita o estudo das interações entre o acúmulo de Aβ e a neurodegeneração. Outro modelo avançado é o 5xFAD, que combina cinco mutações genéticas, incluindo APP e PSEN1, com mutações adicionais que aceleram o aparecimento de placas Aβ e NFTs, resultando em neurodegeneração precoce. Este modelo é amplamente utilizado para estudar a progressão rápida da patologia, o que o torna ideal para ensaios terapêuticos e investigações da neuroinflamação e da disfunção sináptica.[108-110]

Por outro lado, o 3xTg-AD combina mutações nos genes APP, PSEN1 e tau, proporcionando a possibilidade de estudar simultaneamente placas Aβ e NFTs. Isso o torna particularmente valioso, pois permite a análise da interação entre essas duas patologias centrais da DA. Este modelo é amplamente utilizado para explorar a propagação da tau e sua relação com as placas Aβ, além de investigar a disfunção neuronal e sináptica.[22,104,106,111]

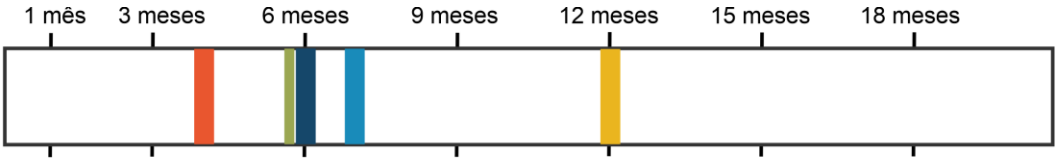
Embora esses modelos transgênicos tenham contribuído significativamente para o entendimento dos mecanismos moleculares da DA, suas limitações incluem o fato de representarem principalmente formas familiares da doença, que são uma fração muito pequena dos casos humanos. A maioria dos casos de DA é

esporádica, e a progressão acelerada nesses modelos pode não refletir com precisão o desenvolvimento gradual da doença em humanos.[112-114] Assim, embora sejam ferramentas poderosas, a relevância para casos esporádicos da DA permanece um desafio a ser superado, limitando sua aplicabilidade em certas abordagens terapêuticas.

1.8.3.1 Modelo 3xTg-AD para investigação dos mecanismos combinados de amiloide e tau

O modelo de camundongo 3xTg-AD da DA foi criado pela inserção dos genes, mutação sueca no gene APP (APPswe) e tau (TauP301L) no embrião de um camundongo transgênico PS1M146V. O gene APPswe é um gene humano com uma mutação associada à DA familiar e o gene PS1M146V que é um gene PSEN1 de camundongo que tem inserida uma mutação humana associada à DA familiar. A mutação TauP301L está associada à patologia da tau humana. Com estes transgenes, o camundongo 3xTg-AD desenvolve patologia amiloide e tau. A primeira patologia detectável é o desenvolvimento de Aβ intracelular aos 3 meses de idade (Figura 10), seguido pelo desenvolvimento de placas extracelulares no córtex e hipocampo aos 6 meses de idade. Já o desenvolvimento da patologia da tau começa aos 6 meses de idade, quando a tau fosforilada é detectável no hipocampo. A tau fosforilada se desenvolve em NFTs a partir dos 12 meses, conforme mostra a figura 10.[22,102-104,115,116]

A deposição de Aβ é progressiva, com imunorreatividade intracelular detectada em algumas regiões do cérebro aos três a quatro meses de idade. Os depósitos extracelulares de Aβ aparecem aos seis meses no córtex frontal e tornam-se mais extensos aos doze meses. Mudanças na proteína tau ocorrem mais tarde; entre 12 e 15 meses, agregados de tau com alteração conformacional e hiperfosforilada são detectados no hipocampo.[117]



Placas	Depósito extracelular de Aβ aos 6 meses no córtex frontal, predominantemente nas camadas 4 e 5, progridem com a idade.
Emaranhados	Aos 12 meses, extensa imunorreação de tau em neurônios CA1 do hipocampo, particularmente neurônios piramidais e posteriormente no córtex. Nenhuma patologia tau em 6 meses.
Gliose	Aumento da densidade de astrócitos imunorreativos GFAP e microglia imunorreativa IBA-1 em comparação com camundongos selvagens em 7 meses. O desenvolvimento de gliose pode ocorrer mais cedo.
Mudanças em PLD/DLD	Em 6 meses há diminuição do PLD comparado com controle selvagem deficiência na transmissão sináptica basal.
Deficiência cognitiva	O comprometimento cognitivo se manifesta aos 4 meses como um déficit na retenção de longo prazo e se correlaciona com o acúmulo de Aβ intraneuronal no hipocampo e na amígdala, mas placas e emaranhados ainda não são aparentes.

CA1: *cornu ammonis 1*; GFAP: proteína glial fibrilar ácida; IBA-1: proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1; PLD: potenciação de longa duração; DLD: depressão de longa duração (hipocampo). Fonte: Traduzido de Research models. Boston: AlzForum Foundation Inc.; 2025. Phenotype characterization [cited 2024 Jun 17]. Available from: https://www.alzforum.org/research-models/3xtg.[118]

Figura 10. Caracterização do modelo transgênico 3xTg-AD

Os camundongos 3xTg-AD são um modelo animal “humanizado”, bem validado, que expressa exclusivamente placas, emaranhados e patologias celulares e cerebrais associadas à DA.[102,104-106] Essa linhagem foi derivada de embriões unicelulares de camundongos portadores de uma mutação *knock-in* de presenilina humana em uma base genética mista. A combinação de placa e desenvolvimento de emaranhado torna o camundongo 3xTg-AD um modelo de camundongo transgênico mais completo.[106]

1.9 Comportamento animal na avaliação da doença de Alzheimer

O uso de testes comportamentais em animais para avaliar a DA é uma prática amplamente difundida e essencial para a investigação dos mecanismos neurodegenerativos subjacentes. As alterações comportamentais em modelos animais de DA são reflexos das disfunções cognitivas causadas pela degeneração em regiões cerebrais específicas, como o hipocampo, envolvido na memória e na aprendizagem.[107, 119] Alterações nas conexões inter-regionais do sistema nervoso central (SNC) são responsáveis por manifestações comportamentais características da DA, como déficits de memória e comportamentos exploratórios anormais.[107]

Uma estratégia amplamente utilizada para a avaliação comportamental em modelos animais da DA é a aplicação de uma bateria de testes, que inclui diferentes métodos para examinar variados aspectos do fenótipo cognitivo e emocional dos animais. Ao combinar múltiplos testes comportamentais, é possível obter uma visão mais abrangente e detalhada das funções cognitivas e emocionais, como memória, aprendizagem, ansiedade e exploração. Essa abordagem integrada é eficaz, pois as variáveis derivadas desses testes proporcionam uma avaliação mais robusta e precisa dos déficits observados nos modelos animais de DA.[107]

Entre os testes mais utilizados está o teste de LAM, reconhecido para avaliar a memória espacial e a capacidade de aprendizagem.[119] Nesse teste, os animais são treinados para encontrar uma plataforma submersa em um tanque de água, e o tempo de latência para localizar a plataforma é registrado, sendo realizado o teste ao longo de vários dias. A memória espacial é testada em fase posterior, em que a plataforma é removida e o tempo que o animal gasta no quadrante onde a plataforma estava é medido. Animais com DA geralmente apresentam déficits significativos nesse teste, refletindo as disfunções do hipocampo.[119,120]

Outro teste comportamental frequentemente aplicado é o teste de reconhecimento do objeto novo, que avalia a memória e aprendizagem. Nesse teste, os animais são expostos a dois objetos idênticos durante a fase de habituação e, posteriormente, um dos objetos é substituído por um novo.[121] O tempo que o animal passa explorando o novo objeto em comparação ao antigo reflete sua capacidade de memória e aprendizagem. Modelos animais de DA, como camundongos transgênicos,

costumam demonstrar uma redução no tempo de exploração do novo objeto, indicando déficits de memória a curto prazo.[122,123]

Além dos testes cognitivos, é comum o uso de testes de ansiedade e de atividade locomotora para avaliar o impacto emocional e comportamental da DA. O teste de campo aberto (TCA), por exemplo, mede os níveis de ansiedade e a atividade exploratória dos animais, fornecendo uma visão mais ampla dos efeitos da neurodegeneração em comportamentos não cognitivos. Animais com DA tendem a demonstrar ansiedade elevada e redução na exploração de ambientes novos, refletindo alterações no sistema límbico e no córtex pré-frontal.[113]

A combinação de múltiplos testes comportamentais é particularmente importante em estudos da DA, pois cada teste oferece uma perspectiva diferente sobre as deficiências cognitivas e emocionais observadas na doença. Ao integrar os resultados obtidos de várias avaliações, os pesquisadores conseguem uma compreensão mais detalhada dos déficits cognitivos e comportamentais associados à DA, permitindo a avaliação mais precisa da progressão da doença e a eficácia de intervenções terapêuticas.[109,124]

Novas abordagens em testes comportamentais para DA também envolvem o uso de tecnologias avançadas, como o rastreamento de movimentos e a análise automatizada de comportamentos, que oferecem maior precisão na detecção de alterações motoras e cognitivas sutis. Combinadas com as técnicas clássicas, essas inovações permitem um estudo mais completo da DA e de suas manifestações comportamentais, facilitando a identificação de biomarcadores comportamentais para diagnóstico precoce e monitoramento da progressão da doença.[125]

Os ciclos circadianos são conhecidos por influenciar funções como locomoção, memória e aprendizado, enquanto variações hormonais específicas ao sexo podem modular ainda mais esses comportamentos. Esses fatores, se não controlados adequadamente, podem introduzir vieses ou variabilidades, dificultando a tradução dos achados pré-clínicos para a prática clínica em humanos.[126,127]

Assim, o comportamento animal oferece uma ferramenta indispensável para a avaliação pré-clínica da DA, fornecendo dados valiosos sobre a disfunção cognitiva e as alterações emocionais induzidas pela doença. O uso de baterias de testes comportamentais permite uma avaliação mais robusta dos déficits associados à DA, e os avanços em métodos de análise de comportamento prometem aumentar

ainda mais a precisão e a aplicabilidade dessas técnicas na pesquisa translacional da doença.

1.10 Objetivos

1. Avaliar biomarcadores na doença de Alzheimer por meio da mensuração dos oligoelementos séricos no modelo animal 3xTg-AD, visando identificar possíveis correlações com a progressão da doença;

2. Avaliar a influência dos períodos matutino e vespertino, em ambos os sexos, nos testes comportamentais, abrangendo locomoção espontânea, habituação em campo aberto e análise da memória espacial e episódica;

3. Avaliar o comportamento por meio da locomoção espontânea e habituação em campo aberto na doença de Alzheimer e envelhecimento saudável;

4. Avaliar a memória espacial e episódica;

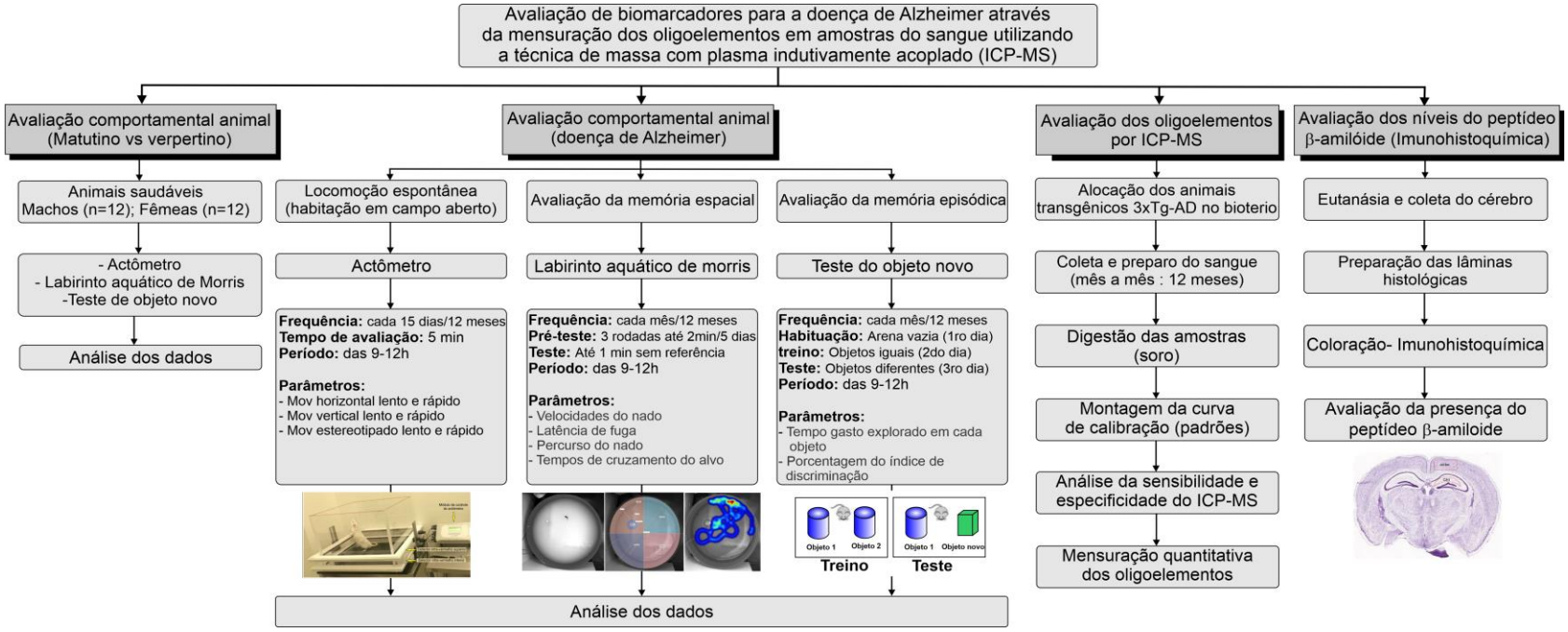
5. Avaliar a concentração dos oligoelementos em amostras de soro pela técnica de ICP-MS, de forma longitudinal;

6. Analisar a sensibilidade e especificidade dos oligoelementos das amostras de soro por ICP-MS, tendo como referência o biomarcador comercial;

7. Avaliar temporal, e descritivamente, os níveis do peptídeo Aβ no sistema nervoso central, mediante técnica de imuno-histoquímica.

2 MÉTODOS

No presente capítulo, apresenta-se a metodologia implementada para a execução dos objetivos deste projeto. Neste sentido a metodologia foi dividida em quatro etapas, avaliação comportamental em períodos (matutino e vespertino), avaliação comportamental para DA e envelhecimento saudável, avaliação dos oligoelementos por ICP-MS e avaliação dos níveis de peptídeo Aβ por imuno-histoquímicas, como se observa na figura 11.



Compreende quatro etapas: a primeira corresponde à avaliação comportamental em animais saudáveis; a segunda aborda a análise comportamental em animais com a doença de Alzheimer; a terceira etapa foca na mensuração de oligoelementos utilizando a técnica de ICP-MS - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; e, por fim, a quarta etapa contempla a avaliação dos níveis do peptídeo Aβ por meio de imuno-histoquímica.

Figura 11. Desenho experimental do estudo

Na primeira etapa, foram analisadas diferenças comportamentais em parâmetros de atividade locomotora, cognição e memória, em dois períodos do dia: manhã (09h – 12h) e tarde (15h – 18h), em ambos os sexos. Para isso, os Grupos foram submetidos aos seguintes testes: atividade locomotora espontânea utilizando um actômetro; locomoção espontânea no campo aberto; avaliação da memória espacial por meio do LAM e avaliação da memória episódica pelo TRO. Os dois primeiros testes foram conduzidos de forma longitudinal, enquanto o último foi realizado de maneira transversal. A comparação final dos resultados considerou tanto as diferenças entre os Grupos quanto entre os gêneros.

Na segunda etapa foi realizada a avaliação comportamental nos animais geneticamente modificados que apresentam a DA. Dentre os testes foi analisada a locomoção espontânea por campo aberto, avaliação da memória espacial por LAM e avaliação da memória episódica por TRO.

Na terceira etapa foi realizada a avaliação dos oligoelementos por meio da técnica de ICP-MS, em amostras de soro de camundongos linhagem consanguínea de camundongos de pelagem preta, sub-linhagem 6 (C57BL/6) controle e camundongos geneticamente modificados para DA 3xTg-AD. A coleta do sangue para obtenção do soro foi realizada mês a mês, ao longo de 12 meses, a partir do segundo mês de vida de cada animal.

Por fim, foi realizada a avaliação dos níveis do peptídeo Aβ por meio da técnica de imunohistoquímica, no qual foram coletados os cérebros de 33 camundongos 3xTg-AD (n=33), sendo 3 animais a cada mês, nos meses 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. O material coletado foi processado e avaliado após fabricação de lâminas histológicas e utilização de anticorpo Aβ. Foram também coletados os cérebros dos animais controle saudáveis, do Grupo de coleta de sangue e avaliação comportamental, para comparação.

2.1 Animais

A distribuição dos animais foi feita em dois grandes Grupos. O primeiro para avaliação comportamental de períodos foi desenvolvido de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) sob o número 4850-21, utilizando 24 ratos Wistar, sendo 12 machos e 12 fêmeas, com 12 semanas.

O segundo Grupo que corresponde ao uso de animais transgênicos 3xTg-AD e C57BL/6 (CEUA 5446-22) para o estudo dos biomarcadores da DA. Para a realização desse estudo, foram utilizados 57 camundongos machos transgênicos 3xTg-AD para DA e 24 camundongos machos C57BL/6 (Grupo Controle). Os camundongos transgênicos 3xTg-AD são amplamente utilizados e contêm três mutações associadas à DA familiar (APPswe, MAPT P301L [*microtubule-associated protein tau mutation*] e PSEN1M146V), são viáveis, férteis e não apresentam anormalidades físicas ou comportamentais nos primeiros meses de vida.

Os animais foram adquiridos do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram alojados no biotério do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP) em gaiolas estéreis sob capelas de fluxo laminar em uma sala com temperatura (22 ± 3 °C), umidade e ciclo de luz controlado e alimentados com ração autoclavada e água ad libitum. O presente estudo segue as normas nacionais da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e internacionais da *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care* (AAALAC) de cuidados com animais de experimentação e o n amostral foi calculado com base nos dados da literatura[68,102,105,110,116,119,128-130] onde foi considerado 20% a mais em cada Grupo por perda nos processos envolvidos nos experimentos.

2.2 Desenho experimental

Como descrito na figura 12, a avaliação comportamental foi dividida em dois experimentos com objetivos diferentes.

O Experimento 1, que utilizou o primeiro Grupo de animais, teve como objetivo avaliar as diferenças comportamentais em dois períodos do dia, manhã (entre 9

e 12h) e tarde (entre 15 e 18h) foi realizado de acordo ao desenho experimental descrito na figura 12, com a participação de 2 Subgrupos (animais para o período de manhã e outros no período da tarde).

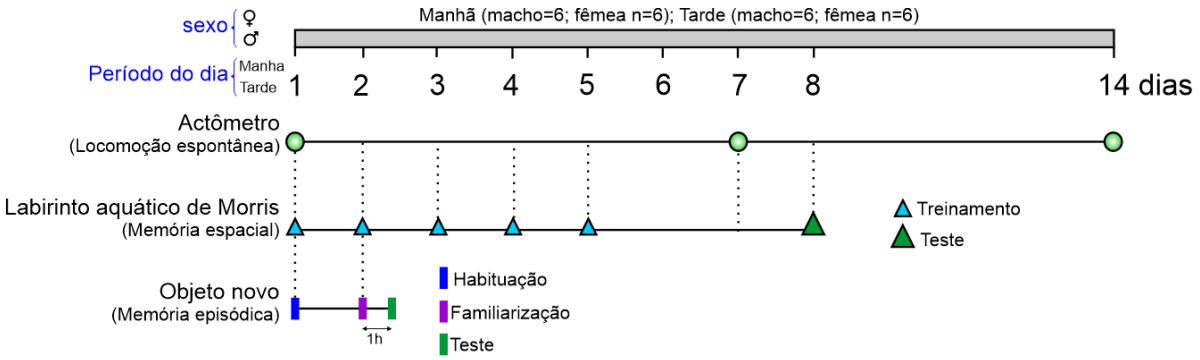


Figura 12. Desenho experimental da avaliação comportamental para investigar a influência dos períodos manhã e tarde

O Experimento 2 que corresponde à avaliação da DA, utilizou os animais do segundo Grupo, e divididos em dois Subgrupos:

- **Subgrupo 1:** Composto por 12 camundongos de cada Grupo (Controle C57BL/6 e Geneticamente Modificados 3xTg-AD), totalizando 24 animais utilizados para a coleta de sangue com o objetivo de quantificar oligoelementos por ICP-MS e para a realização de testes comportamentais ao longo de 12 meses (Figura 13).
- **Subgrupo 2:** Composto por 33 camundongos de cada Grupo (Controle e 3xTg-AD). Nesse Subgrupo, foram realizadas coletas de cérebro de 3 animais por mês (meses de coleta: 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 meses) para a avaliação dos níveis de peptídeos β-amiloide, conforme representado no desenho experimental da figura 13.

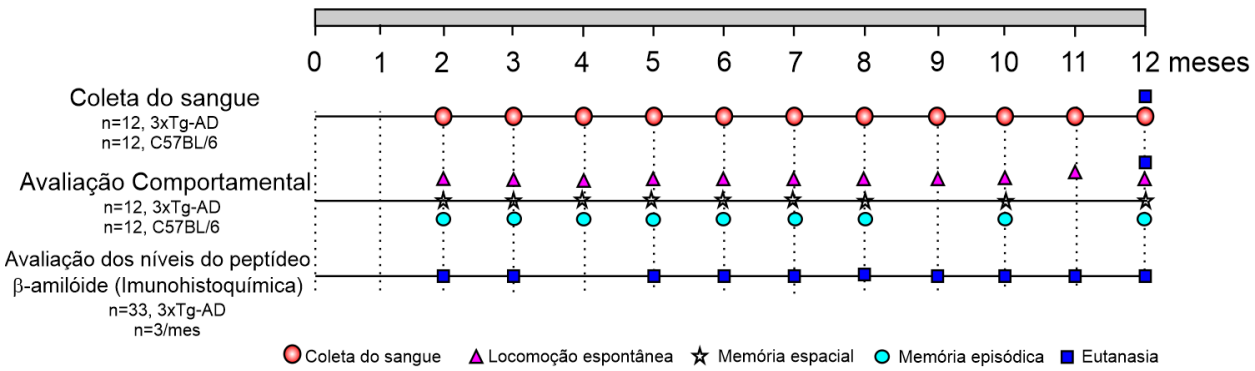


Figura 13. Desenho experimental que compreende os experimentos de coleta de sangue, avaliação comportamental e eutanásia para coleta do cérebro e avaliação imunohistoquímica

2.3 Avaliação comportamental

A avaliação comportamental foi realizada mediante os testes de locomoção espontânea e habituação em campo aberto, avaliação da memória espacial ou testes de LAM e TRO.

A aclimatação dos todos os animais à sala foram realizados 30 minutos antes de cada teste comportamental. Todos os equipamentos foram higienizados com álcool 5% entre cada animal, e entre cada rodada quando necessário.

2.3.1 Locomoção espontânea por campo aberto

A atividade locomotora espontânea foi quantificada utilizando o sistema *Infrared Actimeter* LE 8825 (Actitrack, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha). Esse sistema é composto por uma superfície quadrada bidimensional (eixos X e Y), um suporte de quadro e uma unidade de controle. Cada frame conta com 16 x16 feixes infravermelhos para a detecção de movimentos, usados para avaliação de atividade geral locomotora (horizontal e vertical), como também movimentos estereotipados ou exploração (detecção de raio-nariz na opção *hole-board*). O aparelho é constituído por um quadro quadrado de 70 x 70 cm^2, rodeado por paredes transparentes de 30 cm de altura. A atividade locomotora espontânea foi quantificada utilizando gaiolas de atividade equipadas com dois feixes infravermelhos horizontais localizados um acima do outro, 4 e 8 cm acima do piso da gaiola para o Grupo de avaliação para DA, e 4 e 11 cm, para o Grupo de avaliação de períodos (Figura 14). Cada animal foi colocado no centro da arena e o comportamento espontâneo rastreado durante 5 minutos.

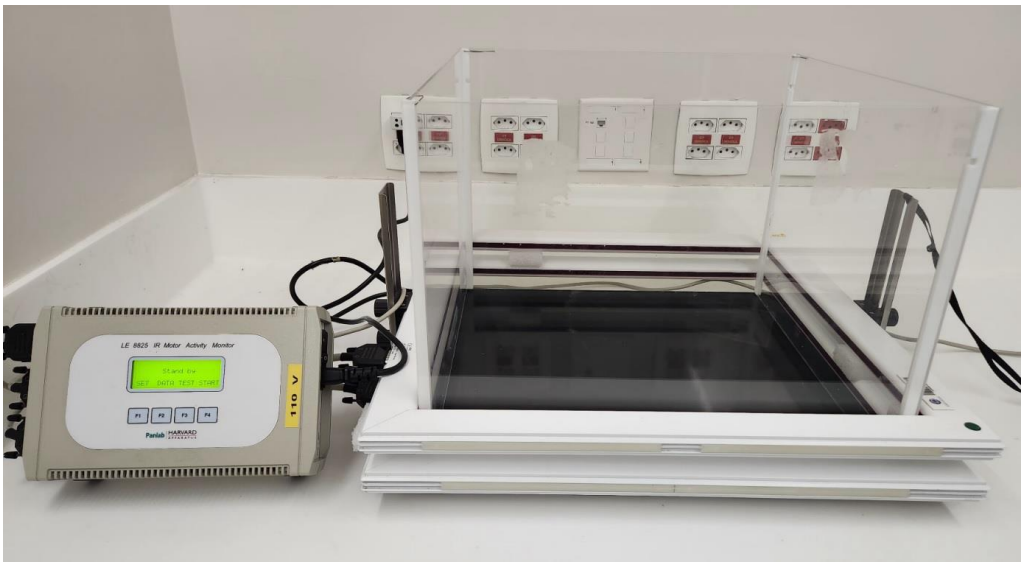


Figura 14. Equipamento para o teste de campo aberto no modelo animal, actômetro

Durante o ensaio, a atividade locomotora horizontal (movimentos ou estereótipos) é determinada por rupturas em fotossensores sensíveis a movimentos que são então convertidos em contagens de atividade locomotora e atividade vertical (número de episódios de criação quebrando os feixes de fotocélula da estrutura superior). O limiar programado para a moldura superior foi de 10 segundos e a moldura inferior de 5 segundos para a velocidade de deslocamento, lenta ou rápida, em todos os movimentos mensurados.

Movimentos horizontais lentos e rápidos, respectivamente, representam o número de deslocamentos abaixo ou acima do limiar. Os movimentos verticais lentos e rápidos representam respectivamente o número de vezes que o animal se levanta abaixo ou acima do limiar. Os dados descritos acima foram processados usando o *software* SEDACOM v2.0. Ao final da sessão, os animais são devolvidos à sua gaiola e a superfície do equipamento limpa com álcool (5%) a cada troca de animal para evitar perturbação do olfato.

2.3.2 Teste de labirinto aquático de Morris

Os testes de LAM foram realizados utilizando uma piscina circular de 180cm de diâmetro equipada com uma plataforma transparente fixada 1 cm abaixo do nível da água, conforme mostra a figura 15A-C.

A arena foi preenchida com água a 37 °C até 30 cm de altura, mantendo a sala a uma temperatura de 21 °C. Foi dissolvido 400g de leite em pó na água, a fim de deixá-la opaca e melhorar a captação e rastreio do movimento no animal durante a avaliação. Na fase de aquisição, uma bandeira foi colocada no topo da plataforma a fim de sinalizá-la e os camundongos foram colocados na piscina para a procura da plataforma livremente por 60 segundos. Os que voluntariamente encontraram a plataforma são autorizados a permanecer na plataforma por 10 segundos, enquanto os camundongos que não conseguiram encontrar a plataforma são guiados até ela e mantidos lá por 10 segundos. Todos os camundongos foram liberados do mesmo quadrante em cada ensaio (quadrante oposto diagonalmente à plataforma), e cada camundongo foi submetido a quatro ensaios por dia durante cinco dias consecutivos. A bandeira de sinalização foi removida no sexto dia, e cada camundongo foi liberado do mesmo quadrante do treino, estando no lado oposto ao local da plataforma e dado 60 segundos para procurá-la na água. Após cada teste, os camundongos foram suavemente secos com uma toalha.

A velocidades de natação (em segundos), latência até a plataforma (em segundos), tempo no quadrante alvo (onde se encontra a plataforma), tempo nos demais quadrantes (em segundos) e distância percorrida (em centímetros) foram analisados usando o *software Noldus EthoVision XT*, (Versão 14*; Noldus Information Technology*, Holanda). O preparo do experimento foi realizado seguindo o seguinte protocolo usando o *software EthoVision XT*:

1. Posicionar a plataforma em um dos quadrantes (Figura 15B);
2. A colocação ou não da bandeira (plataforma oculta ou visível).

No *software EthoVision XT* foi criado um experimento utilizando o *template* de *Water Maze* e realizado a seguinte configuração:

a. Na ferramenta *‘Experiment settings’* foi seleciona a câmera de captação dos movimentos;

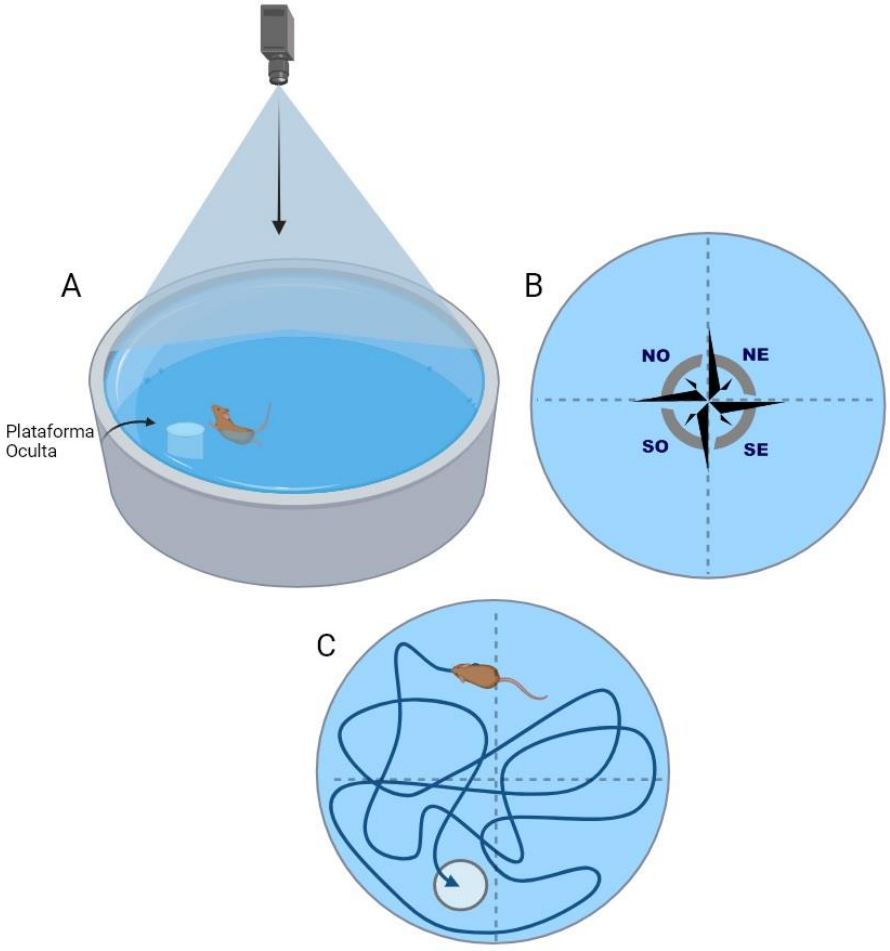
b. Ajustados os parâmetros de luz e resolução de acordo com a luz da sala;

c. Os quadrantes foram definidos em *'Arena Settings'* (Figura 15B);

d. Defino o tempo e condições dos testes na ferramenta *'Trial control Setting'*;

e. Configura os Grupos do experimento na ferramenta *'Trial list'*;

f. Em *'Detection settings'* foi realizado a configuração necessária para detecção do animal, que depende da luz da sala e da cor do animal, principalmente.



Elaborada com a ferramenta BioRender.com. Disponível em: BioRender.com. NO: noroeste; NE: nordeste; SO: sudoeste; SE: sudeste; (A) representação da arena de teste com a plataforma oculta; (B) arena é dividida em quadrantes e a plataforma é posicionada em um deles; (C) deslocamento do animal na arena.

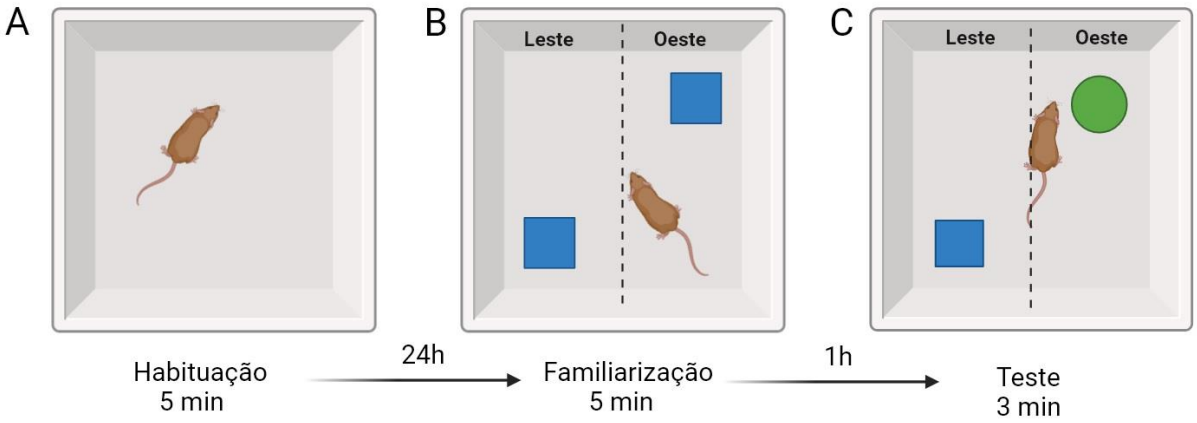
Figura 15. Representação do experimento labirinto aquático de Morris

2.3.3 Teste de reconhecimento de objeto novo

O TRO foi utilizado para avaliar a cognição, particularmente a memória de curto prazo, em modelos de murinos com distúrbios do SNC. Este teste é baseado na tendência espontânea dos murinos de passar mais tempo explorando um objeto novo do que um familiar. A escolha de explorar o novo objeto reflete o uso da memória de aprendizagem e reconhecimento.

A tarefa foi conduzida em uma arena de campo aberto (70 x 70 cm), com fundo branco e paredes de 30 cm de altura.

Na primeira etapa de habituação, os animais foram colocados para explorar a arena vazia por 5 minutos (Figura 16A). Após 24 horas, os animais foram expostos à mesma arena com dois objetos idênticos, colocados a uma distância igual, por 5 minutos (Figura 16B). Após 1 hora, os animais foram colocados novamente na arena na presença de um objeto familiar e de um novo objeto por 3 minutos, sendo ambos consistentes em altura e volume, mas de forma e cores diferentes (Figura 16C). O objeto novo sempre foi colocado no quadrante leste. Esta última etapa foi registrada e analisada utilizando um modelo do *software EthoVision XT (Noldus Information Technology*, Holanda). Devido à necessidade de gravação, os testes foram realizados com pouca luz de 20-40 lux. A presente avaliação foi realizada no período da manhã a partir do segundo mês de idade até o 14° mês, totalizando 12 meses de avaliação.



Elaborada com a ferramenta BioRender. Disponível em: BioRender.com. (A) fase de habituação com o animal em uma caixa vazia; (B) fase de familiarização com dois objetos idênticos, 24 horas após a habituação; (C) teste de objeto novo com um objeto utilizado na fase de familiarização e um objeto novo, 1 hora após a fase anterior.
Figura 16. Representação do experimento teste de reconhecimento de objeto novo

Os parâmetros obtidos pelo *EthoVision XT* foram velocidade, mensurado em segundos, distância percorrida em centímetros, tempo de exploração do objeto familiar (T_F) e tempo de exploração do novo objeto (T_N), medidos em segundos. Foram consideradas exploração as ações de tocar, cheirar e se aproximar do objeto familiar e novo, num raio de 2cm. Para análise dos dados foi considerado o índice de reconhecimento, (RI - *recognition index*), expresso pela equação: $RI = T_N/(T_N + T_{F)}\text{x}100$, que é representado em porcentagem sendo que quanto mais próximo de 100%, maior o tempo gasto na exploração do objeto novo, como demonstrado em outros trabalhos.[105,121,123]

2.4 Anestesia e eutanásia

Para o procedimento de coleta de sangue, os animais foram anestesiados utilizando Isoflurano (Isoforine®, Cristália, Brasil) por meio de uma caixa de acrílico, acoplada ao sistema de anestesia. Em seguida, foi liberado para a caixa, o fluxo de 2,5 mL/min de O_2, com saturação de 2,5% de Isoflurano. Após a indução, com imobilidade e perda dos reflexos posturais (cerca de 2 minutos) foram iniciados os procedimentos de coleta de sangue. Para a realização da eutanásia, os animais receberam três vezes a dose anestésica do coquetel de cloridrato de cetamina (Syntec, Brasil) 1 mL/kg a 100 mg/mL e cloridrato de xilazina (Syntec, Brasil) 0,5 mL/kg a 20 mg/mL.

2.5 Determinação dos oligoelementos em amostras do soro por ICP-MS

2.5.1 Reagentes e produtos químicos

Água Milli-Q (18MΩ) foi utilizada de um sistema de água destilada e deionizada (Integral 15, Millipore Milli-Q®). Soluções padrões multielementares (Cu, Fe, Zn, Se, Mg e Mn; PerkinElmer® Pure Plus) foram adquiridas e usadas para preparar soluções diluídas. O equipamento de ICP-MS (NexION 350X, Perkim Elmer) foi calibrado por soluções padrão de elemento único que foram diluídos na faixa de 0,05 até 10 ppb,

faixa de interesse de quantificação dos oligoelementos e solução de Ródio (Rd) foi usada como padrão interno.

A solução diluente das amostras é composta de ácido nítrico (HNO_3) 65% (100456, Sigma Aldrich) e H_2O_2 30% (107209, Sigma Aldrich). O soro de oligoelementos e o intervalo normal de oligoelementos de controle foram usados como materiais de referência certificados. Um misturador vortex (V1 S000, Ika) foi utilizado para garantir a homogeneidade das amostras. Tubos de 1,5 mL, tubos de polipropileno de 15 e 50 mL livre de metais com tampa de polietileno de alta densidade (HDPE - *high density polyethylene*) e frascos de Nalgene Teflon™ foram usados para preparação das amostras, armazenamento e tubos de análise de ICP-MS, respectivamente.

2.5.2 Coleta e pré-preparo das amostras de sangue

O sangue foi coletado pela via intravenosa pelo seio retrorbital, sendo extraídos 500 µL de sangue, mensalmente, de cada animal, em microtubo de 1,5 mL (Eppendorf®, Brasil). O soro foi separado da amostra de sangue por centrifugação a 3500 rpm por 15 min a 4 ºC e posterior congelamento a -80 °C.

2.5.3 Digestão de amostras de soro para medidas quantitativas por ICP-MS

Para a digestão das amostras, foram removidas do armazenamento a -80 °C e descongeladas à temperatura ambiente e agitadas em vórtex para garantir a homogeneização completa. O processo se iniciou com adição de 100 µL de cada amostra para tubos de 1,5 mL de polipropileno, seguidamente foram adicionados 300 µL de HNO_3 e 100 µL de H_2O_2, os tubos contendo as amostras foram submetidos a tratamento térmico na temperatura de 60ºC e agitação a 450 rpm durante 1 hora utilizando o equipamento ThermoMixer C (Eppendorf®, Alemanha). Finalmente, foram obtidas amostras transparentes, as quais foram um indicativo de uma eficiente digestão. As amostras digeridas foram armazenadas a -20 ºC até análise quantitativa por ICP-MS. Para análise quantitativa as amostras foram diluídas 500X (quinhentas vezes) em Água Milli-Q a 2% de HNO_3.

2.5.4 Curvas de calibração e uso de soluções padrão de referência certificados para análise quantitativa por ICP-MS

Foram obtidas soluções padrão certificadas dos elementos Cu, Zn e Se na concentração de 1000 ppm.

Para construção das curvas de calibração dos elementos Cu, Zn e Se, foram feitas diluições das soluções padrão nas concentrações de 0,2, 0,5, 0,8, 1, e 2 ppb, usando água Milli-Q a 2% de HNO_3 para um volume de 10 mL.

Para verificar a variação instrumental, foi preparado 10 mL de cada solução padrão para concentração conhecida de 0,8 ppb. A solução padrão de referência, Soro Normal de Camundongo (NS03L, Sigma-Aldrich) foi utilizada para validação do processo de quantificação, para análise quantitativa esta amostra foi digerida da mesma forma que as amostras de soro do sangue. O elemento Rd foi utilizado como padrão interno para correções de interferências na quantificação dos analitos de interesse no soro.

2.5.5 Análise por ICP-MS e parâmetros instrumentais

Para realizar as análises quantitativas foi utilizado ICP-MS (Perkin Elmer, NexION 350X). Nas amostras de soro do sangue, foram quantificados traços dos seguintes oligoelementos: Cu, Zn e Se, conjuntamente com os seus isótopos.

O sistema de ICP-MS é equipado, principalmente, com amostrador de platina, cone *skimmer* e cone *hiperskimmer*, um sistema de introdução de amostra composto por um nebulizador concêntrico de vidro cônico, sonda de 0,5 mm de diâmetro interno e uma câmara de pulverização ciclônica. A taxa de fluxo de amostra foi ajustada de maneira automatizada. O fluxo de gás de argônio e a posição da tocha foram ajustadas diariamente, visando otimizar as condições para atingir alta intensidade do sinal e baixa taxa de óxido.

Para o processo de quantificação dos analitos de interesse foi utilizada a célula de reação dinâmica (DRC – *dynamic reaction cell*) que este modelo possui, e as condições experimentais foram mantidas iguais, como indicadas na tabela 1.

Tabela 1. Condições de análise do equipamento ICP-MS

Parâmetro	Valor
Potência	1600 W
Plasma	18 L min^{-1}
Auxiliar	1,0
Vazão de ar nebulizador	0,93
Leituras por replicatas	50
Duplicatas	3
Dwell time	50 ms
Operação do detector	*Dual mode*
Isótopos utilizados para quantificação	^{64}Zn, ^{78}Se, ^{63}Cu
Padrão interno	$^{103}Rh^{+}$

Zn: Zinco; Se: Selênio; Cu: Cobre; ICP-MS: Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*).

2.5.6 Avaliação da sensibilidade e especificidade dos oligoelementos das amostras de soro por ICP-MS

Para a avaliação da sensibilidade da técnica de ICP-MS, as amostras processadas foram diluídas até a não detectabilidade dos oligoelementos sobre análise. A quantificação destes oligoelementos foi acompanhada por curvas de calibração que abrangem padrões certificados com diferentes concentrações dos elementos alvos. Esta análise semi-automatizada foi acompanhada pela mensuração em triplicata.

A avaliação da especificidade foi realizada usando padrões internacionais específicos para cada oligoelemento avaliado. Adicionalmente, o padrão de referência soro normal de camundongo (NS03L, Sigma-Aldrich) foi utilizado para validação dos procedimentos analíticos propostos e foram preparadas da mesma forma que as amostras do plasma dos animais.

2.5.7 Branco e calibração do branco

A calibração do branco foi realizada para garantir a precisão e exatidão, e assegurar que as interferências entre o branco e as amostras fossem consistentes. Foi utilizada a solução "*NexION STD/DRC Mode Detection Limit Blank*" (TruQ™ms, Perkin Elmer), com matriz de 0,5% de HNO_3. Após configuração do equipamento, a solução do branco foi introduzida para análise. Os valores obtidos foram registrados para cálculo do fator de correção, o qual foi aplicado às medições das

amostras. Para validar a calibração, uma amostra conhecida foi analisada e os resultados obtidos foram comparados aos valores esperados, garantindo a acurácia necessária para as análises das amostras.

2.5.8 Otimização da cela de reação dinâmica para medidas quantitativas via ICP-MS

Na análise quantitativa por ICP-MS, a utilização de uma cela de reação dinâmica desempenha um papel fundamental na minimização de interferências espectrais, especialmente para elementos como Cu, Zn e Se, que frequentemente sofrem interferências isobáricas e poliatômicas. Para este estudo, o gás metano foi selecionado como gás de reação, e seu fluxo foi ajustado com precisão para otimizar a remoção dessas interferências sem comprometer a sensibilidade e a precisão das medidas.

O processo de otimização envolveu uma série de testes com fluxos variáveis de metano, onde cada condição foi monitorada cuidadosamente em termos de relação sinal/ruído para cada elemento alvo. A seleção do fluxo ideal de gás foi baseada no ponto em que se obteve a melhor relação sinal/ruído, garantindo maior clareza nas medições de Cu, Zn e Se. Esse ponto ideal equilibrou a eficiência na remoção de interferências com a necessidade de manter uma sensibilidade elevada, essencial para a detecção precisa em concentrações traço.

Além disso, durante o processo de ajuste, foi considerada a influência do fluxo de metano na estabilidade do plasma e na consistência do sinal ao longo das análises. A otimização permitiu não apenas minimizar interferências, mas também preservar a integridade dos sinais analíticos, resultando em uma configuração robusta para análises quantitativas de alta precisão e confiabilidade com a técnica ICP-MS. Essa configuração otimizada proporciona uma plataforma adequada para estudos em que a exatidão dos níveis de Cu, Zn e Se é crítica, sobretudo em amostras com matrizes complexas.

2.5.9 Limites de detecção e quantificação

A partir das curvas de calibração dos elementos Cu, Zn e Se foram calculados, mediante o *software Syngistix*, os limites de detecção (LD), de quantificação (LQ) e a concentração equivalente ao fundo (BEC - *background equivalent concentration*) dos oligoelementos em análise. O LD foi determinado como a concentração mínima do analito que produz sinal igual a três vezes o desvio padrão branco. O LQ foi estabelecido como a concentração mínima do analito que produz um sinal igual a dez vezes o desvio padrão do branco, mediante a seguinte equação: $\mathrm{LQ} = 3{,}3\mathrm{xLD}$.

2.6 Avaliação dos níveis do peptídeo Aβ no sistema nervoso central, mediante a técnica de imunohistoquímica

A presença de peptídeo Aβ total foi identificada por meio de imunohistoquímica. Os cérebros foram coletados nos meses 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, armazenados em solução de paraformaldeído 10% para fixação por 24 horas na geladeira e depois, transferidas para uma solução de sacarose a 30%, onde ficaram também na geladeira, por, aproximadamente, 48 horas, ou até que todo o cérebro estivesse no fundo do recipiente. Após esse processo, os cérebros foram congelados a -80ºC em solução OCT (*optimal cutting temperature)* até o momento do corte, que foi realizado em criostato *(*Leica Biosystems, Alemanha) na espessura de 15 µm.

As lâminas com os cortes foram deixadas para secar em temperatura ambiente por 20 minutos, em seguida mergulhadas em álcool gelado por 10 minutos e depois, rehidratadas em tampão fosfato (3 vezes por 10 minutos cada). Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, através de lavagem em H_2O_2 0,3%. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário (beta *amyloid polyclonal antibody*, 36-6900; *Thermo Fisher Scientific*), na diluição 1:200 em solução de albumina sérica bovina (BSA - *bovine serum albumin*) 1% e triton 0,3%. A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB), sendo imersos em solução de DAB por 1 minuto e 30 segundos, sendo posteriormente lavados (3 vezes por 5 minutos cada). Foi feita a contracoloração com hematoxilina de Harris, por 5 minutos, em seguida, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70, 90 e 100%), imersas em xilol e cobertas com lamínulas com solução de Permount™.

As marcações foram avaliadas na amígdala basomedial: entre -1,70 e -1,22 mm pós Bregma, no córtex: entre -2,06 e -1,70 mm post Bregma; na região CA1 do hipocampo: entre -2,06 e -1,70 mm post Bregma; e no subículo (pertencente à formação hipocampal): entre -3,08 e -2,80 mm.

O anticorpo primário utilizado se liga em epítopos localizados nos aminoácidos 3 a 8 da porção terminal amina da sequência do peptídeo Aβ. Isso significa que pode se ligar, tanto à proteína APP inteira, quanto ao peptídeo livre. Desta forma, neste estudo, a detecção da proteína APP e/ou do peptídeo Aβ por meio do anticorpo foi descrita como marcação positiva para o anticorpo ou derivações semelhantes, de forma qualitativa.

2.7 Análises estatísticas

Os dados foram mostrados por meio da média e desvio padrão de cada Grupo analisado e verificado sua distribuição e variância para a escolha do teste estatístico, utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As comparações transversais em cada sessão e longitudinais entre sessões foram realizadas pelo teste de *t* de Student, para dois Grupos (Grupo Controle e Grupo DA) e teste ANOVA para mais de dois Grupos. Nos resultados significativos, foram realizadas a análise de *post hoc* para melhorar a interpretação dos dados. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* JASP (0.16.4) e Origin 9.1 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, EUA) e os resultados foram considerados significativos para valores de p inferior a 0,05.

3 RESULTADOS

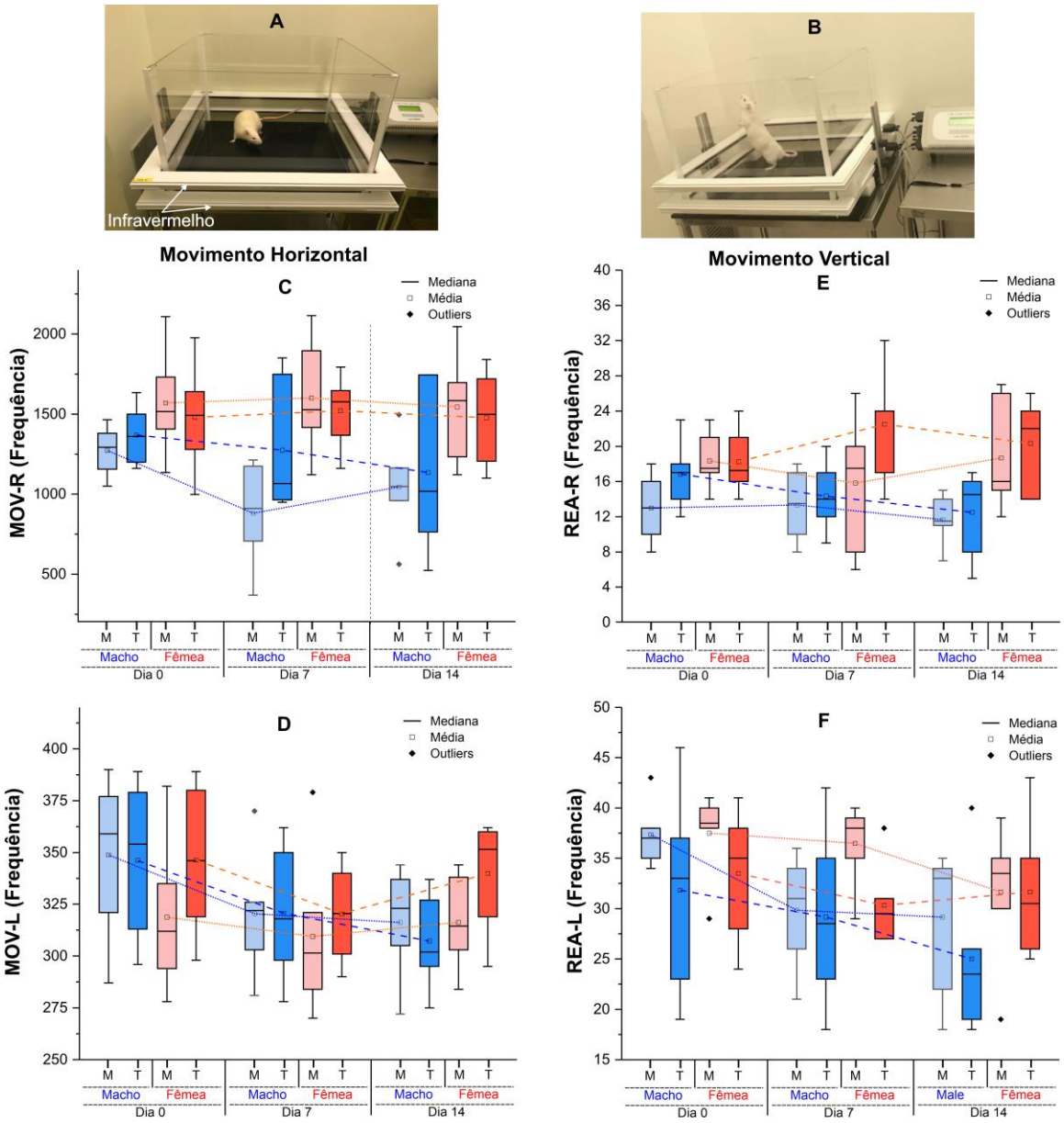
3.1 Avaliação comportamental nos períodos matutino e vespertino

3.1.1 Locomoção espontânea em campo aberto

Os movimentos espontâneos foram avaliados considerando a frequência de movimentos horizontais e verticais, lentos e rápidos, durante 5 min em cada gênero (macho e fêmea), de acordo com o período do dia (manhã e tarde), em cada sessão (0, 7 e 14 dias) e entre as sessões (longitudinal) como mostrado na figura 17.

No dia 0 (D0), a análise transversal do movimento horizontal rápido (MOV-R; Figura 17 A e C), considerando os efeitos do sexo, hora do dia e sua interação, não revelou diferenças significativas em nenhum dos fatores (Tabela 2). Os Grupos mostraram padrões de movimento semelhantes, com valores ligeiramente mais altos observados em fêmeas tanto pela manhã quanto à tarde.

Em contraste, nos dias 7 (D7) e 14 (D14) foi observado um efeito significativo do sexo ($p=0,002$ e $p=0,012$, respectivamente), com fêmeas demonstrando maior movimento em comparação aos machos (Figura 17 C), enquanto os efeitos da hora do dia e sua interação não foram significativos, conforme ilustrado na figura 17C e na tabela 2. O teste *post hoc* realizado em D7 e D14 identificou uma diferença significativa apenas em D7, especificamente entre os sexos em horários diferentes (comparando fêmeas à tarde com machos pela manhã; $p=0,017$) e entre os sexos pela manhã ($p=0,007$).



Machos pela manhã são representados em azul claro, machos à tarde em azul escuro, fêmeas pela manhã em vermelho claro e fêmeas à tarde em vermelho escuro. MOV-R: movimento rápido; MOV-L: movimento lento; REA-R: *rearing* rápido; REA-L: *rearing* lento; M: manhã; T: tarde. Representação dos movimentos (A) horizontal e (B) vertical. O movimento horizontal foi classificado em padrões (C) rápidos e (D) lentos, enquanto o movimento vertical foi dividido em padrões (E) rápidos e (F) lentos.

Figura 17. Movimento espontâneo horizontal e vertical utilizando o actômetro

Na análise longitudinal de movimento horizontal rápido dentro de cada Grupo (Figura 17C), foi observado que os padrões de movimento das fêmeas mantiveram-se consistentemente mais altos ao longo do tempo em comparação com os dos machos. No entanto, o teste ANOVA não mostrou efeito significativo da sessão (Tabela 2).

Tabela 2. Análises descritivas e de ANOVA da frequência de movimento em cada parâmetro no teste de movimento espontâneo, considerando os movimentos horizontais rápidos e lentos (MOV-R e MOV-L) e movimentos verticais rápidos e lentos (REA-R e REA-L) por sexo (feminino e masculino), hora do dia (manhã e tarde) e seção (dias 0, 7 e 14)

Sessão	**Condição**	**Fêmea**		**Macho**		**ANOVA (Valor-p)**		
	MOV-R	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Efeito sexo	Efeito tempo	Interação
D0	Média	1569,2	1480,0	1272,8	1369,2	0,073	0,974	0,399
	DP	334,6	332,4	154,1	178,5			
D7	Média	1600,5	1520,8	881,0	1274,5	**0,002**	0,265	0,099
	DP	359,9	223,9	313,5	414,8			
D14	Média	1544,5	1477,5	1046,0	1135,5	**0,012**	0,942	0,613
	DP	334,5	307,3	302,7	509,5			
ANOVA (Valor-p)	Efeito sessão	0,961	0,959	0,067	0,596			
	MOV-L							
D0	Média	318,8	346,3	348,8	346,2	0,356	0,441	0,352
	DP	36,5	35,1	39,1	40,5			
D7	Média	309,5	320,3	320,4	320,6	0,682	0,685	0,700
	DP	23,5	23,5	32,9	31,5			
D14	Média	316,3	339,8	316,2	307,2	0,159	0,524	0,162
	DP	23,4	26,9	28,8	24,9			
ANOVA (Valor-p)	Efeito sessão	0,885	0,299	0,259	0,200			
	REA-R							
D0	Média	18,2	18,3	16,8	13,0	**0,034**	0,221	0,202
	DP	3,6	3,2	3,8	3,9			
D7	Média	15,8	22,5	13,3	14,3	**0,033**	0,115	0,238
	DP	7,6	6,3	4,2	3,9			
D14	Média	18,7	20,3	11,7	12,5	**0,001**	0,542	0,838
	DP	6,3	5,2	2,8	4,8			
ANOVA (valor-p)	Efeito sessão	0,676	0,384	0,713	0,232			

continua...

...continuação

	REA-L							
D0	Média	37,5	33,5	37,3	31,8	0,730	0,085	0,775
	DP	4,3	6,4	3,2	9,7			
D7	Média	36,5	30,3	29,8	29,2	0,118	0,170	0,265
	DP	4,1	4,1	5,6	8,6			
D14	Média	31,7	31,7	29,2	25,0	0,136	0,488	0,488
	DP	6,8	6,8	7,2	7,9			
ANOVA (Valor-p)	Efeito sessão	0,153	0,653	**0,043**	0,419			

MOV-R: movimento rápido; MOV-L: movimento lento; REA-R: *rearing* rápido; REA-L: *rearing* lento.

Para movimento horizontal lento (MOV-L, Figura 17D), a análise transversal revelou comportamento semelhante entre os sexos, hora do dia e na iteração dos fatores para os dias D0, D7 ou D14, sem diferenças significativas na frequência de movimento para essas variáveis, conforme determinado pelo teste ANOVA (Tabela 2). Da mesma forma, na análise longitudinal de movimento horizontal lento (MOV-L) dentro de cada Grupo, o teste ANOVA indicou nenhum efeito significativo da sessão (D0, D7 ou D14) para qualquer Grupo (Tabela 2).

Apesar da falta de resultados significativos nas análises transversais e longitudinais, os movimentos vespertinos das fêmeas mostraram consistentemente uma frequência mais alta do que os dos machos ao longo do tempo. Em contraste, os movimentos matutinos das fêmeas tiveram frequência menor do que os dos machos nos dias 0 e 7, mas, no dia 14, as fêmeas superaram os machos tanto nas sessões matutinas quanto nas vespertinas, como foi encontrado em movimento horizontal rápido.

Na análise transversal dos movimentos verticais rápidos (REA-R, Figura 17E, Tabela 2), foram observadas diferenças significativas apenas para o efeito do sexo em todas as sessões (D0: p=0,034; D7: p=0,033; e D14: p=0,001), mantendo as fêmeas em todas as sessões com uma frequência mais alta em comparação com os machos. A análise *post hoc* indicou diferenças significativas entre machos pela manhã (M_m) e fêmeas à tarde (F_t) em D14 (p=0,030), e uma tendência significativa para a mesma comparação em D7 (p=0,052) e entre F_t e machos à tarde (M_t) em D14 (p=0,055). Longitudinalmente, as fêmeas exibiram uma frequência mais alta de movimentos verticais em comparação com os machos, um padrão já observado em movimentos horizontais rápidos.

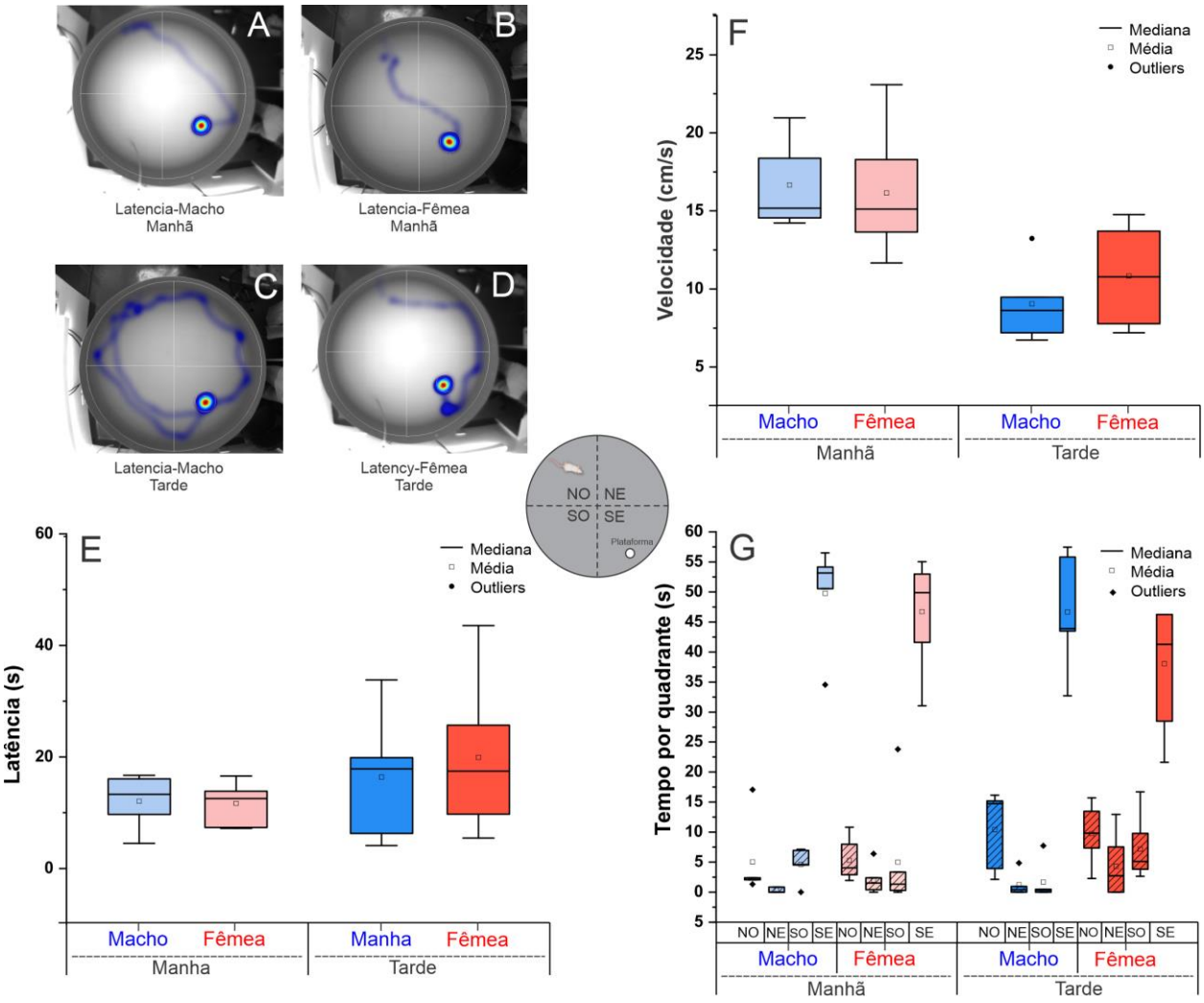
No entanto, esse aumento nas fêmeas foi mais pronunciado em movimentos verticais durante a tarde, como também foi evidente nos machos. Apesar dessas diferenças, não foram observados efeitos significativos nas sessões em nenhum Grupo, conforme ilustrado na figura 17E e detalhado na tabela 2.

Na análise transversal de movimento vertical lento (REA-L, Figura 17F), as fêmeas demonstraram uma frequência de movimento mais alta do que os machos em todos os pontos de tempo. Curiosamente, ambos os sexos exibiram maiores frequências de movimento pela manhã em comparação à tarde, espelhando o padrão observado em movimento horizontal rápido. No entanto, o ANOVA não revelou diferenças significativas em nenhuma seção (D0, D7 ou D14).

Na análise longitudinal, apenas os machos pela manhã (M_m) mostraram resultados significativos pelo ANOVA (p=0,043), com o teste *post hoc* indicando uma diferença marginal entre D0 e D14 (p=0,058), sugerindo um declínio acentuado na frequência de movimento ao longo do tempo.

3.1.2 Teste de labirinto aquático de Morris

A mensuração da latência até a plataforma durante o teste de LAM (Figura 18 A-E) não mostrou diferenças significativas ao comparar o sexo, a hora do dia e a interação desses fatores. (Figura 18E e Tabela 3).



Azul representa machos e vermelho representa fêmeas, com tons mais claros para sessões matutinas e tons mais escuros para sessões vespertinas. (A-D) mapas de calor representativos da latência para escapar para animais machos e fêmeas durante as sessões da manhã (A, B) e da tarde (C, D). Estes mapas ilustram os caminhos de natação percorridos para localizar a plataforma oculta; (E) latência de escape (s); (F) velocidade média de natação (cm/s); (G) tempo gasto em cada quadrante (s), rotulados como: NO (Noroeste), NE (Nordeste), SO (Sudoeste) e SE (Sudeste, quadrante alvo).
Figura 18. Desempenho no labirinto aquático de Morris por sexo e horário do dia

Tabela 3. Análises descritivas e de ANOVA do teste do labirinto aquático de Morris sobre a latência de escape, o tempo de exploração por quadrantes, a velocidade média por sexo (feminino e masculino) e a hora do dia (manhã e tarde)

Parâmetro		Fêmea		Macho		ANOVA (valor-p)			
		Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Efeito sexo	Efeito tempo	Efeito quadrante	Interação
Latência da plataforma	Média	11,7	19,9	12,1	16,4	0,709	0,145	-	0,644
	DP	3,7	13,6	5,0	11,9				
Velocidade	Média	16,2	13,9	16,7	9,1	0,256	**0,018**	-	0,167
	DP	4,0	6,4	2,9	2,6				
SE	Média	46,7	38,0	49,8	46,7	0,895	0,965	**<,001**	0,998@ 0,115# **0,058&** 0,593^
	DP	9,0	10,8	8,8	10,2				
NO	Média	5,3	9,7	5,0	10,4				
	DP	3,4	4,8	6,7	6,8				
NE	Média	2,0	4,3	0,3	1,2				
	DP	2,3	5,3	0,4	2,1				
SO	Média	5,0	7,2	4,6	1,7				
	DP	9,3	5,2	2,9	3,4				

SE: sudeste; NO: noroeste; NE: nordeste; SO: sudoeste; DP: desvio padrão; @: interação entre sexo e tempo; #: interação entre sexo e quadrantes; &: interação entre tempo e quadrantes; ^: interação entre sexo, tempo e quadrantes.

Na análise da velocidade média (Figura 18F e Tabela 3), foi encontrada uma diferença significativa apenas para o efeito do período de avaliação (manhã maior que tarde) (ANOVA, p=0,018), como também ocorreu na análise do novo objeto, mas em padrão oposto (tarde maior que manhã). No entanto, não houve resultado significativo nas comparações dois a dois da análise *post hoc* do efeito do tempo, apenas uma tendência foi encontrada entre machos pela manhã e à tarde (p=0,059).

Ao analisar o tempo de exploração por quadrantes durante o teste (Figura 18G e Tabela 3), sexo e período de teste, foi encontrada uma diferença significativa entre os quadrantes (ANOVA: p<0,001), principalmente no tempo de exploração no SE, que foi significativamente maior em relação aos outros (SO, NE e NO; teste *post hoc*, p<0,001), alvo onde a plataforma foi colocada, assim como o quadrante NO apresentou um resultado significativo e maior em relação ao NE (teste *post hoc* p=0,029), conforme pode ser visto na figura 18G.

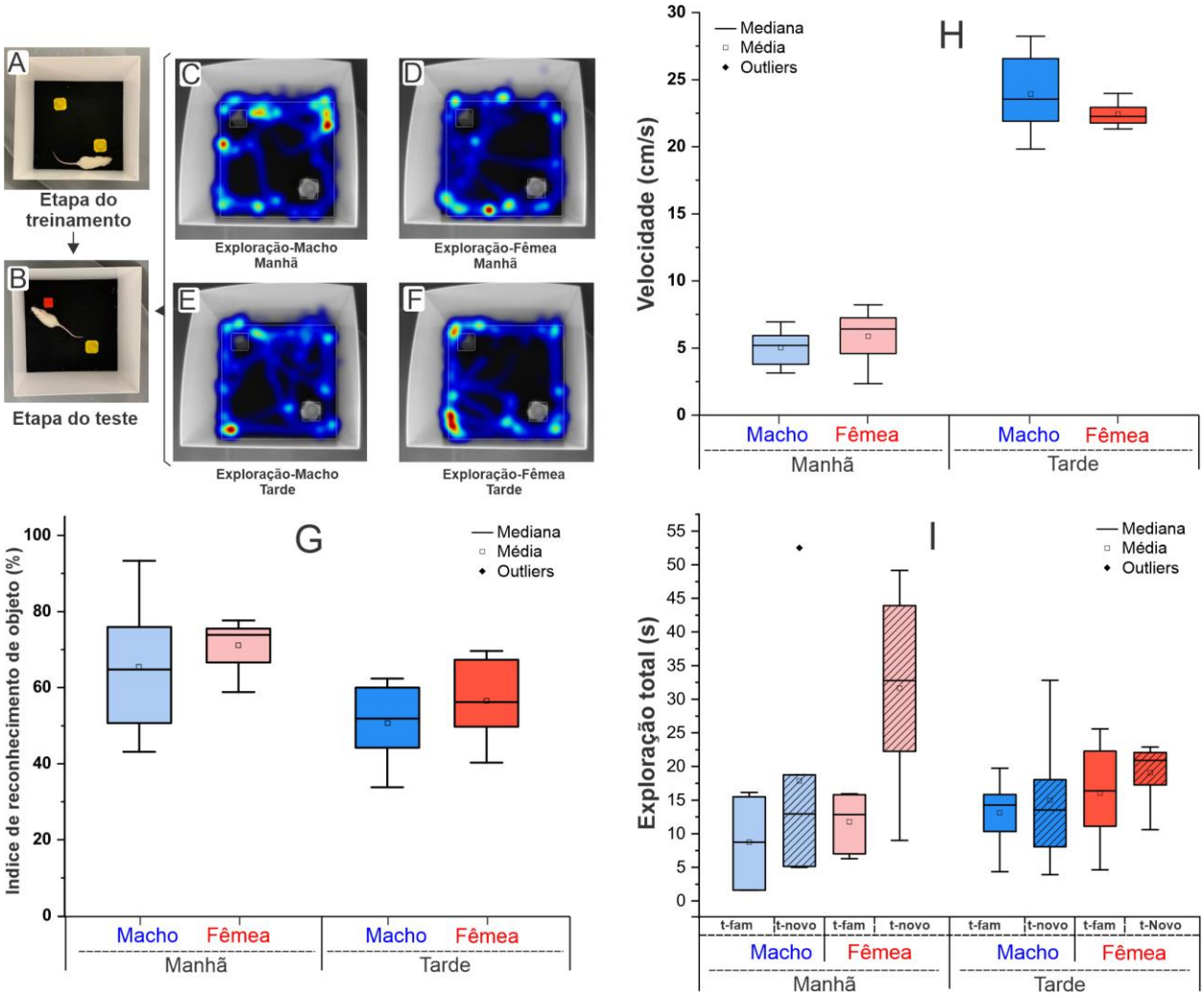
A interação entre quadrantes e período de teste mostrou uma tendência de significância (p=0,058) e sua análise *post hoc* indicou uma diferença significativa do SE manhã com os outros quadrantes da manhã e tarde (p<0,001) e entre NO manhã com SE tarde (p<0,001) e NE manhã com SE tarde (p<0,001) e NO tarde (p=0,043), mas também entre SO manhã com SE tarde e entre este e NO, NE e SO tarde (p<0,001).

3.1.2 Teste de reconhecimento de objeto novo

Na análise do TRO (Figura 19 A-F) pelo índice de reconhecimento (IR) entre sexo, hora do dia e sua interação (Figura 19G e Tabela 4), foi observado resultado significativo apenas para o efeito do tempo (ANOVA: manhã x tarde, p=0,012), com IR mais alto pela manhã para ambos os sexos, mas a análise *post hoc* mostrou apenas uma tendência (p=0,058) na comparação entre fêmeas pela manhã e machos à tarde, com resultados extremos entre as variáveis.

Na análise da velocidade média de exploração dos objetos, encontramos um efeito significativo apenas no horário do teste (ANOVA: p<0,001), em que ambos os sexos mostraram maior velocidade na avaliação vespertina, conforme mostrado na figura 19H e na tabela 4. Isso foi confirmado pela análise *post hoc*, que revelou uma diferença significativa (p<0,001) entre fêmeas pela manhã e à tarde, o mesmo ocorrendo entre machos, bem como, entre fêmeas pela manhã com machos à tarde e machos pela manhã com fêmeas à tarde.

Na análise da exploração total entre objetos familiares e novos (Figura 19I, Tabela 4), sexo e horário, foi observado um resultado significativo no teste ANOVA para o efeito do tipo de exploração (familiar *versus* nova exploração: p=0,006), a interação entre período e tipo de exploração (p=0,048) e uma tendência para o sexo (p=0,050). Considerando a análise *post hoc* da interação dos três fatores (tipo de exploração, horário e sexo), diferença significativa foi observada apenas entre os tipos de exploração (familiar *versus* novo) para fêmeas pela manhã (p=0,033, o *boxplot* vermelho claro da Figura 19I) e entre os tipos de exploração (familiar *versus* novo) e sexos pela manhã (p=0,008, os *boxplots* vermelhos e azuis claros da Figura 19I). Portanto, como esperado no teste, o objeto novo foi explorado mais do que o objeto familiar e essa exploração foi mais evidente em fêmeas pela manhã, nos machos a hora do dia não influenciou muito.



Azul representa machos e vermelho representa fêmeas, com tons mais claros indicando dados coletados durante a manhã e tons mais escuros representando dados da tarde. (A e B): fase de treinamento e teste, respectivamente, na qual os animais foram expostos a dois objetos idênticos para se familiarizarem com o ambiente. Em seguida, um objeto foi substituído por um objeto novo, e a exploração em ambos foi medida; (C-F): mapas de calor ilustrando os padrões de exploração para animais machos e fêmeas durante os períodos da manhã (C, D) e da tarde (E, F), mostrando a distribuição da atividade na arena de teste; (G): índice de reconhecimento (IR, %); (H): velocidade média (cm/s); (I): (s) tempo total de exploração; (t-fam) para os objetos familiar (t-novo) novo.

Figura 19. Avaliação comportamental no teste de reconhecimento de objeto novo, ao longo do dia e do sexo

Tabela 4. Análise descritiva e de ANOVA do teste de reconhecimento de objeto novo sobre o índice de reconhecimento, tempo total de exploração, velocidade média por sexo (feminino e masculino) e hora do dia (manhã e tarde)

Parâmetro		Fêmea		Macho		ANOVA (Valor-p)			
		Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Efeito sexo	Efeito tempo	Tipo de exploração	Interação
Índice de reconhecimento	Média	0,7	0,6	0,6	0,5	0,290	**0,012**	-	0,975
	DP	0,10	0,1	0,2	0,1				
Velocidade	Média	5,9	22,4	5,0	23,9	0,694	**<,001**	-	0,178
	DP	2,1	0,9	1,4	3,1				
Exploração novo	Média	31,6	19,1	17,9	14,9	0,050	0,571	**0,006**	0,412@ 0,319# **0,048&** 0,425^
	DP	15,5	4,6	17,8	10,1				
Exploração familiar	Média	11,8	16,1	8,7	13,1				
	DP	4,3	7,7	7,1	5,3				

@: interação entre sexo e hora; #: interação entre sexo e tipo de exploração; &: interação entre hora e tipo de exploração; ^: interação entre sexo, hora e tipo de exploração.

3.2 Avaliação comportamental para doença de Alzheimer

3.2.1 Locomoção espontânea por campo aberto

A atividade locomotora espontânea foi quantificada pela frequência de movimentos horizontais e verticais, considerando tanto os movimentos rápidos quanto os lentos ao longo dos 12 meses de acompanhamento entre os Grupos Controle (C) e modelo de DA.

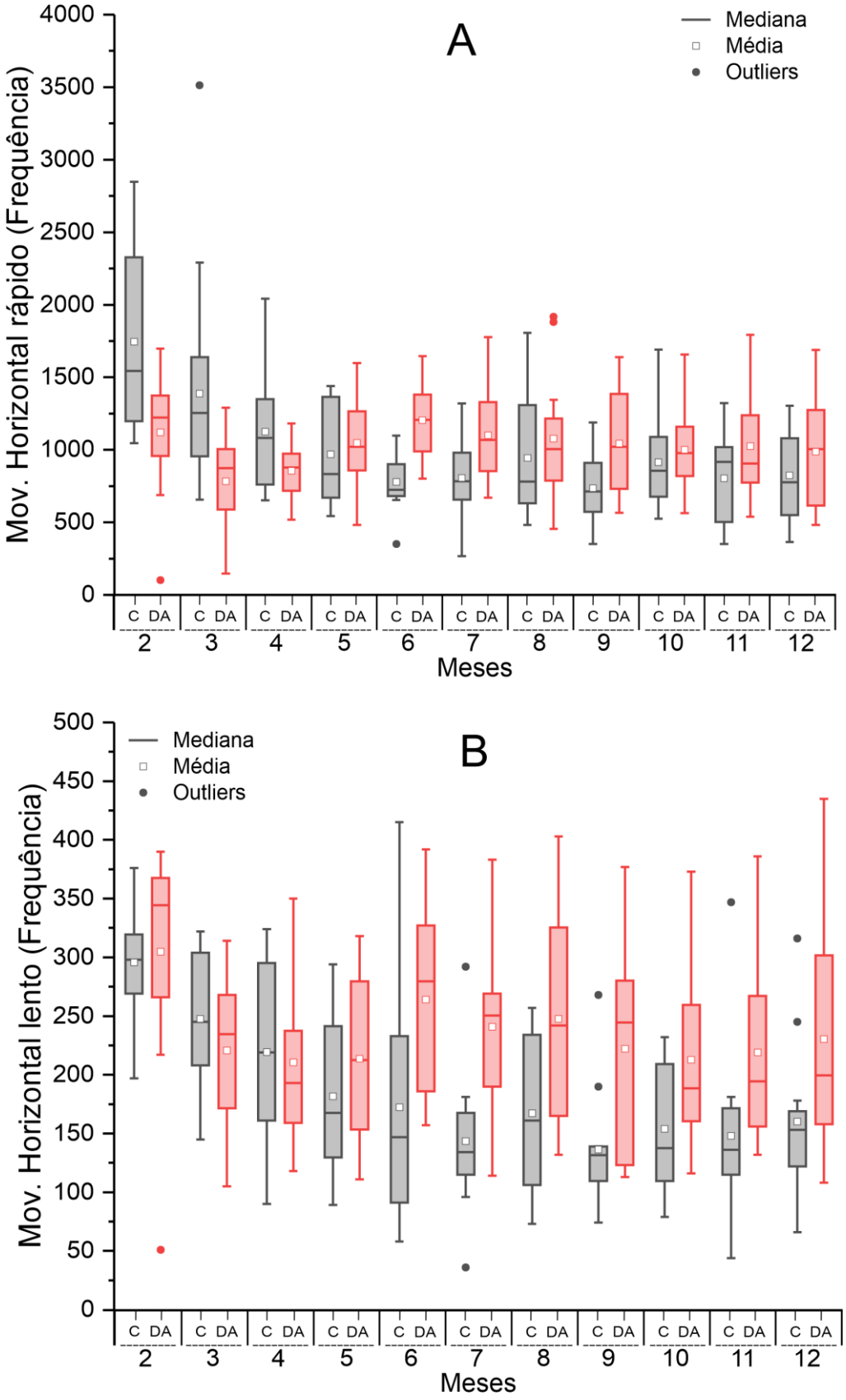
Na análise horizontal rápida (Figura 20A) se observou que os animais do Grupo C (*boxplot* cinza) apresentaram uma frequência maior que os Grupos DA (*boxplot* vermelho) nos três primeiros meses, com um declínio progressivo. No quarto mês, o Grupo DA progrediu em relação ao Grupo C e se manteve mais ativo até o final dos 12 meses. Na análise de ANOVA, somente foi significativo o efeito tempo e a interação entre tempo e Grupo ($p<0,001$). Já no efeito Grupo, o valor de p foi de 0,409. Na análise de *post hoc* do efeito tempo, verificou-se que o 2º mês foi diferente de todos os outros meses ($p<0,05$), com exceção da comparação do 2º com o 3º mês ($p=0,051$).

Já na interação dos fatores tempo e Grupo, foi verificado na comparação dois a dois, que o Grupo C no 2º mês foi diferente do Grupo DA em todos os tempos ($p<0,01$), menos no 6º mês ($p=0,097$) e diferente do Grupo C a partir do 4º mês ($p<0,01$). O Grupo C no 3º mês foi diferente do Grupo DA no mesmo tempo ($p=0,006$) e no 4º mês ($p=0,038$) e com o Grupo C no 6º mês ($p=0,005$), 7º mês

(p=0,011), 9º mês (p=0,002) e do 11º a 12º mês (p<0,01). Portanto, houve diferença significativa entre os Grupos nos meses 2 (p=0,011), 3 (p=0,007), 4 (p=0,055), 6 (p<0,001), 7 (p=0,024), 9 (p=0,023) e 12 (p=0,049).

Na análise horizontal lento (Figura 20B) foi observado o mesmo padrão de movimento ao longo do tempo, observado acima. Os animais do Grupo C (*boxplot* cinza) iniciaram com uma frequência maior que a do Grupo DA (*boxplot* vermelho) nos três primeiros meses, com um declínio progressivo a ponto do Grupo DA superar e apresentar maior frequência de movimento dos meses seguintes até o final e, com uma diferença mais expressiva que o movimento rápido, como pode ser visto na figura 20B nos *boxplots* vermelhos em relação aos *boxplots* cinza. Pelo teste de ANOVA, foi encontrada diferença significativa para o efeito Grupo e tempo (p<0,001), como também, para interação dos fatores (p=0,035).

Na análise de *post hoc* foi possível observar que a diferença temporal ocorre entre o 2º mês e com os demais, a partir do 4º mês (p<0,01), nas outras, não foi mais significativo. Na análise dois a dois dos fatores da interação, notou-se diferença significativa na comparação do Grupo C no 2º mês e com ele mesmo, a partir do 5º mês (p<0,05) e do Grupo DA no 2º mês com o Grupo C a partir do 5º mês (p<0,01) e do Grupo C 3º mês com 7º e 9º mês (p<0,05). Portanto, na comparação individual dos Grupos mês a mês foi evidenciado diferença significativa entre os Grupos a partir do 6º mês até o final (p<0,05).

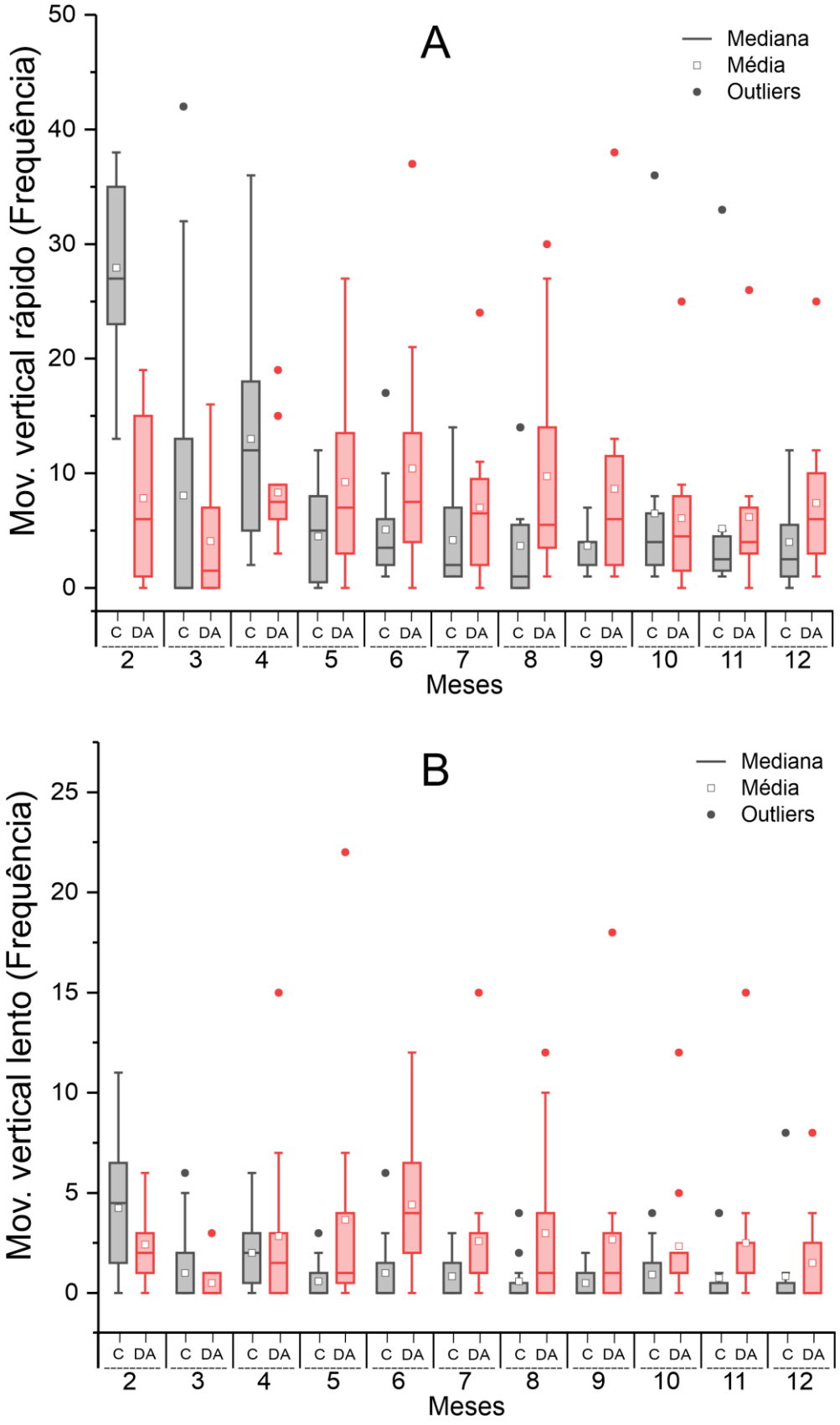


C: Grupo Controle; DA: Grupo Doença de Alzheimer; (A): frequência dos movimentos horizontais rápidos; (B): frequência dos movimentos horizontais lentos.

Figura 20. Frequência de movimentos horizontais ao longo dos 12 meses dos Grupos Controle, na cor cinza e Grupo Doença de Alzheimer, na cor vermelha

Na análise vertical rápida (Figura 21A) pode-se observar que os animais do Grupo DA apresentam uma frequência inferior ao Grupo C nos três primeiros meses, mas depois a frequência aumenta progressivamente, se mantendo superior aos controles até o 12º mês de avaliação. Na análise de ANOVA, verifica-se diferença significativa para o efeito tempo e a interação tempo e Grupo ($p<0,001$). Já o efeito Grupo não foi significativo para esta variável ($p=0,3834$). Na análise individualizada dos Grupos, mês a mês, a diferença entre Grupos foi significativa no 2º e 12º mês ($p=0,050$) e apresentou uma tendência no 8º mês ($p=0,071$). Considerando a interação dos dois fatores (tempo e Grupo), verificou-se diferença significativa na análise de *post hoc* em todas as comparações do Grupo C do 2º mês com ele mesmo e nos outros tempos (3 a 12 mês), e com o Grupo DA, em todos os tempos ($p<0,001$).

Já na frequência de movimentos verticais lentos (Figura 21B), o teste de ANOVA mostrou diferença significativa somente para o efeito Grupo ($p<0,001$), para efeito tempo e interação não foi significativa ($p=0,175$ e $p=0,127$, respectivamente). Na análise de Grupos por mês, a diferença ocorreu principalmente no 6º mês ($p=0,006$) e uma tendência no 8º mês ($p=0,062$), mantendo novamente o padrão encontrado no movimento rápido nos três primeiros meses da avaliação. O Grupo C manteve frequências mais altas (*boxplots* cinza) que o Grupo DA (*boxplots* vermelhos) e depois inverteu até o final dos 12 meses.

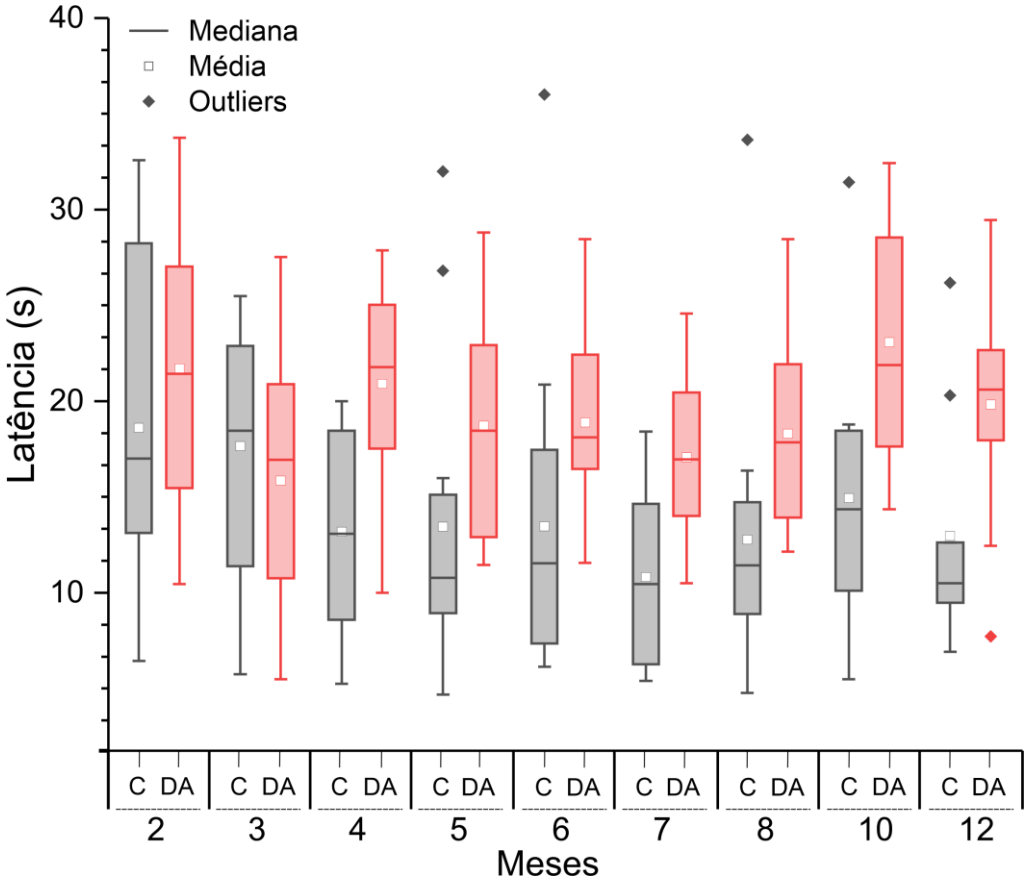


C: Grupo Controle; DA: Grupo Doença de Alzheimer; (A): frequência dos movimentos verticais rápidos; (B): frequência dos movimentos verticais lentos.
Figura 21. Frequência de movimentos verticais ao longo dos 12 meses

3.2.1 Teste de labirinto aquático de Morris

O teste de LAM foi avaliado pela variável latência, que correspondeu ao tempo que o animal levava para chegar na plataforma e pela variável velocidade. A latência foi avaliada ao longo dos 12 meses e na figura 22 podemos observar que os *boxplots* na cor cinza que corresponde ao Grupo C houve uma diminuição ao longo do tempo até o mês 5 e depois um certo platô, refletindo assim o aprendizado ao teste, levando cada vez menos tempo para atingir o alvo. Já o Grupo DA (*boxplot* vermelhos da Figura 22), houve uma diminuição nos dois primeiros meses, depois um aumento no 4º mês que se manteve com valores mais altos de latência até o final dos 12 meses em relação ao Grupo C, o que pode refletir a questão fisiopatologia da DA decorrente com comprometimento no aprendizado e memória, para lembrar o local da plataforma, requerendo assim mais tempo que o Grupo C. Analisando estes resultados pelo teste de ANOVA, verificamos que houve significância somente para o efeito Grupo ($p<0,001$), efeito tempo e interação o valor de p foi 0,176 e 0,338, respectivamente. Na análise de *post hoc* o efeito Grupo se manteve o valor de $p<0,001$ e nas outras variáveis não houve diferença significativa na combinação dois a dois.

Na análise de Grupo individual, mês a mês, foi observado diferença significativa principalmente no 4º mês ($p=0,010$), 7º mês ($p=0,007$), 8º mês ($p=0,050$), 10º mês ($p=0,009$) e 12º mês ($p=0,017$). O quarto mês de vida do animal com DA é o início o processo do comprometimento de memória (déficit cognitivo), decorrente da patologia e neste período já observamos sinais de comprometimento, como evidência o teste comportamental e nos momentos finais esta diferença ainda foi mais evidente em relação ao Grupo C.



C: Grupo Controle; DA: Grupo Doença de Alzheimer. Tempos que o animal leva para chegar nadando até a plataforma.
Figura 22. Teste de labirinto aquático de Morris, análise da variável latência em segundos ao longo de 12 meses

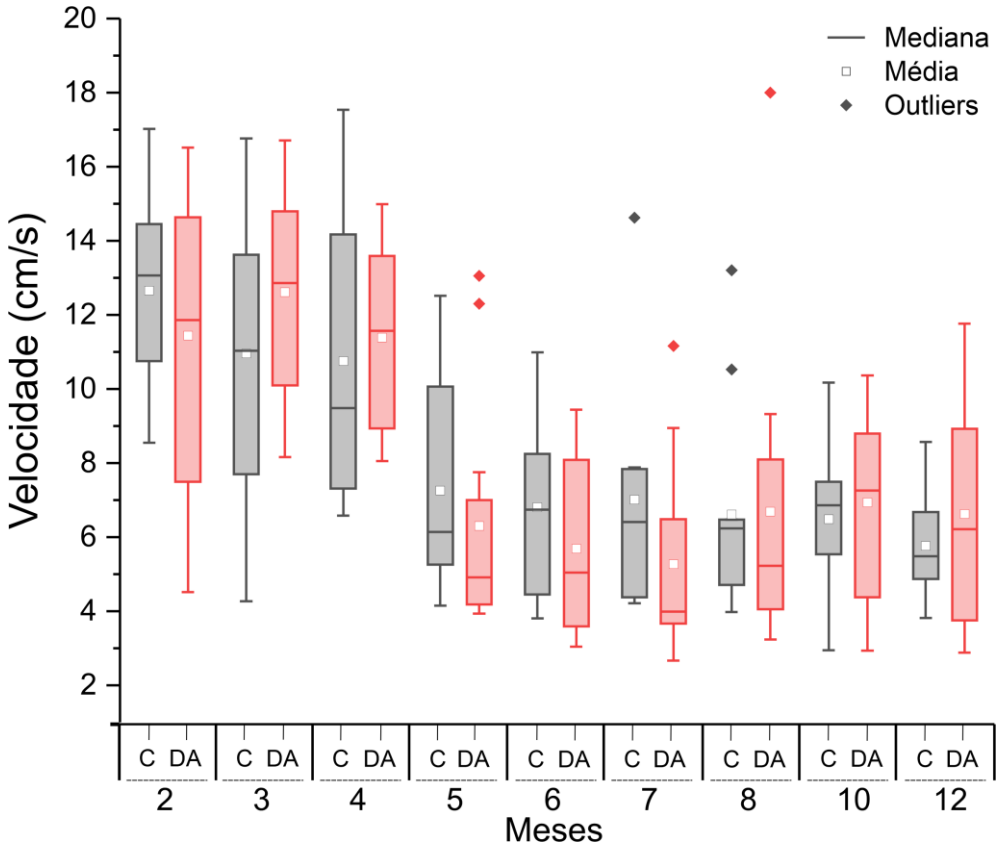
Na análise da variável velocidade, mostrado na figura 23, pode-se visualizar que até o 4º mês os valores da velocidade foram maiores que os demais meses em ambos os Grupos, estando o Grupo DA com velocidade média maior que o Grupo C no 3º e 4º meses, já nos demais meses o Grupo C manteve uma média de velocidade maior que o Grupo DA, com exceção dos dois últimos meses.

No teste de ANOVA, verificamos que houve somente efeito significativo para o tempo ($p<0,001$), efeito Grupo e interação os valores de p foram 0,735 e 0,657, respectivamente. Na análise de *post hoc*, foi observada diferença significativa do efeito tempo na comparação do 2º mês o os demais ($p<0,001$), com exceção do 3º e 4º meses, na sequência verificou-se que o 3º e 4º meses também apresentaram diferença significativa ao serem comparados com os demais meses ($p<0,001$), com exceção na comparação entre eles.

No *post hoc* da interação, verificou-se que houve diferença significativa do Grupo C no 2º mês com ele mesmo e o Grupo DA do 5º ao 12º mês

(p<0,01). O Grupo DA no 2º mês foi diferente significativamente com o ele mesmo do 5º ao 7º mês e no 12º mês (p<0,01), o Grupo C no 3º mês com o Grupo DA do 5º ao 7º mês e no 12º mês (p<0,01), o Grupo DA no 3º mês com ele mesmo e o Grupo C do 5º ao 12º mês (p<0,001), o Grupo C no 4º mês com o Grupo DA no 7º mês (p=0,012) e o Grupo DA no 4º mês com ele mesmo no 5º ao 7º mês e no 12º mês e Grupo C no 8º ao 12º mês (p<0,01).

Na análise de Grupo Individual, mês a mês, não foi observada diferença significativa. Portanto, o comportamento da velocidade variou ao longo do tempo de forma significativa, mas não entre os Grupos, pois ambos apresentaram o mesmo padrão ao longo do tempo.



C: Grupo Controle; DA: Grupo Doença de Alzheimer.

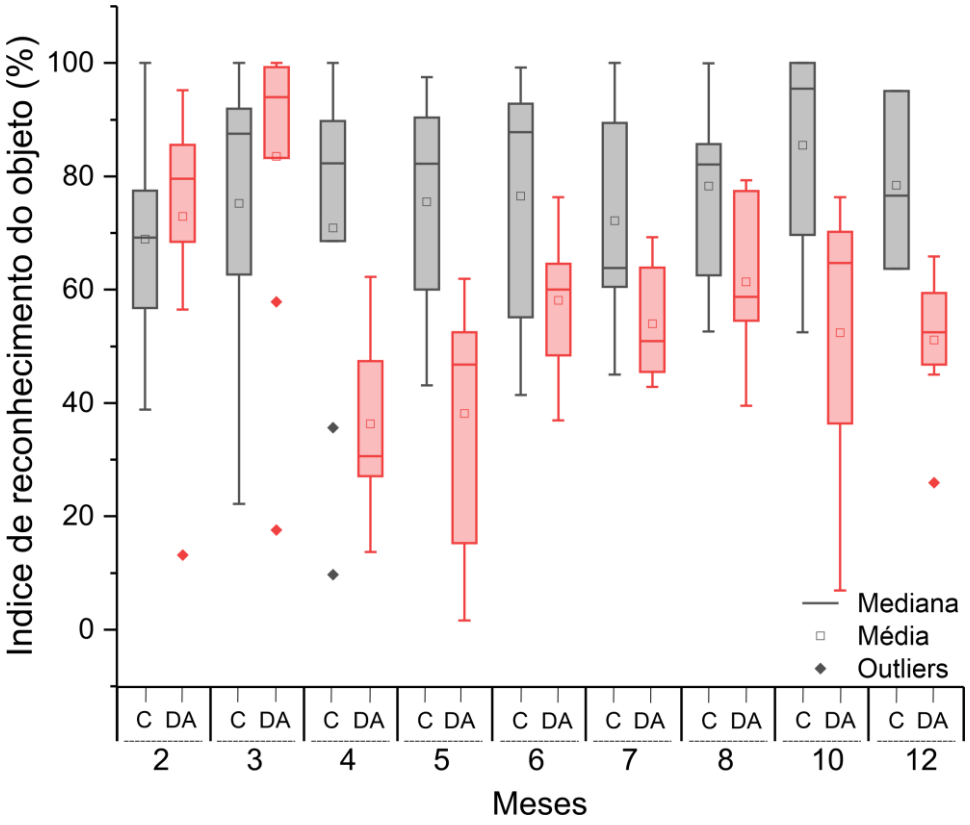
Figura 23. Velocidade teste de labirinto aquático de Moris, análise da variável velocidade em centímetros por segundo ao longo de 12 meses

3.2.2 Teste de reconhecimento de objeto novo

Analisando o índice de TRO em relação ao familiar ao longo dos 12 meses, podemos observar na figura 24, que o Grupo DA só esteve com maior escore nos dois primeiros meses em relação ao Grupo C, depois do 4º mês, o Grupo DA teve um declínio acentuado e uma recuperação suave, mas sempre com escore bem inferior ao Grupo C, que ao longo dos 12 meses, teve uma média com leves flutuações. Pelo teste de ANOVA, houve efeito significativo para o tempo, Grupo e Interação ($p=0,005$, $p<0,001$ e $p=0,002$, respectivamente). Para melhor entendimento de como ocorrem estas diferenças foi aplicado o teste de Grupo, no qual foi observado que para o efeito tempo na combinação dois a dois, as comparações que foram significativas se encontraram entre o 3º e 4º mês ($p=0,003$), como também, entre 3º e 5º mês ($p=0,011$).

Já na Interação, houve resultado significativo entre Grupo C 2º mês com Grupo DA 4º mês ($p=0,042$), entre Grupo C 3º mês com Grupo DA 4º e 5º mês ($p=0,004$), entre Grupo C 4º mês com Grupo DA 5º mês ($p=0,046$), entre Grupo C 5º mês com Grupo DA 4º e 5º mês ($p=0,004$), entre Grupo C 6º mês com Grupo DA 4º e 5º mês ($p<0,01$), entre Grupo C 7º mês com Grupo DA 4º e 5º mês ($p<0,01$), entre Grupo C 8º mês com Grupo DA 4º e 5º mês ($p<0,01$), entre Grupo C 10º mês com Grupo DA 4º e 5º mês ($p<0,001$), entre o Grupo DA 2º mês com DA no 4º e 5º mês ($p<0,01$), entre o Grupo DA 3º mês com DA no 4º e 5º mês ($p<0,001$), outras comparações não foram significativas.

A análise entre os Grupos Individualizados mês a mês, observados resultados significativos nos seguintes meses de avaliação, 4º mês ($p=0,007$), 5º mês ($p<0,001$), 7º mês ($p=0,016$), 20º mês ($p=0,014$) e 12º mês ($p=0,013$), conforme pode ser visualizado na diferença dos *boxplots* (vermelho *versus* cinza) da figura 24. Estes resultados são coerentes com a literatura em relação ao tempo, pois este modelo de DA só começa a apresentar déficits comportamentais após o quarto mês de vida e com relação ao comportamento inferior do Grupo DA em relação ao controle, pode ser devido ao avanço da patologia o animal tende a ter um menor escore de índice de reconhecimento, como foi apresentado nesse estudo.



C: Grupo Controle; DA: Grupo Doença de Alzheimer.
Figura 24. Índice de reconhecimento de objeto novo ao longo de 12 meses

Outra métrica utilizada no TRO é a exploração total que foi analisada pelo tempo de exploração no objeto familiar e novo em cada Grupo ao longo dos 12 meses. Com relação à exploração do objeto familiar, pelo teste de ANOVA só foi possível observar resultado significativo para o efeito tempo ($p<0,001$), já para o efeito Grupo como esperado não foi observado diferença significativa ($p=0,472$), nem para a interação dos dois fatores ($p=0,074$).

Para entender melhor como ocorreu esta diferença, apesar de visualmente pela figura 25 podemos ver que o resultado do tempo de exploração foi diminuindo ao longo do tempo e apresentou diferença significativa pelo teste de *post hoc* entre os seguintes meses, 2º mês com o 7º, 8º, e 10º mês ($p<0,003$) e 4º mês com o 7º, 8º e 10º mês ($p<0,01$).

Analisando os Grupos de forma individualizada mês a mês para esta medida de exploração do objeto familiar, observados resultados significativos no 10º mês ($p=0,029$) e tendência no 5º mês ($p=0,70$), 7º mês ($p=0,056$), conforme pode ser visualizado nos *boxplots* (cinza e azuis) da figura 25. Como esperado, a exploração do objeto familiar não apresentou diferença entre os Grupos, o que se deu somente no 10º

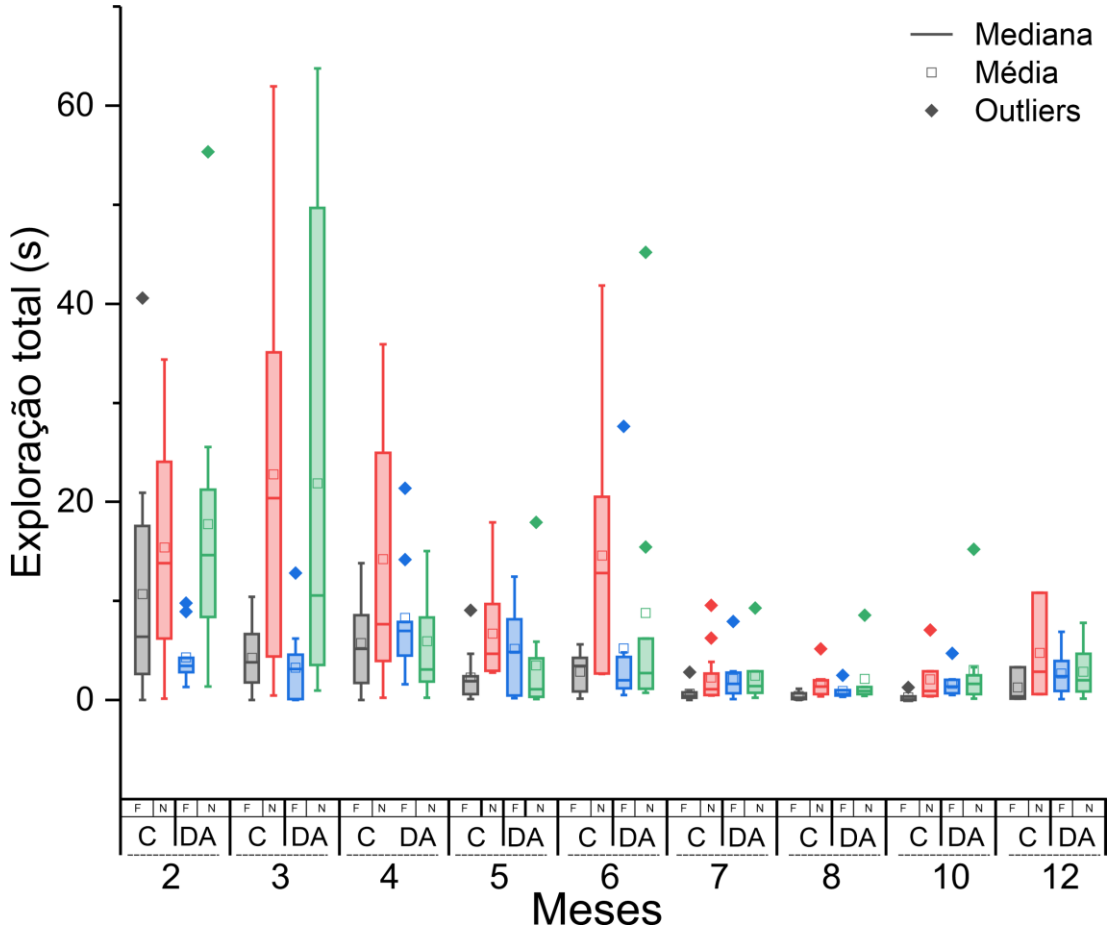
mês, nos outros os resultados foram similares, já em relação ao tempo, é comumente relatada a diminuição do tempo de exploração devido ao efeito de habituação ao longo a longo, razão da evidente esta diferenciação temporal, principalmente entre os tempos iniciais com os finais.

O tempo de exploração do objeto novo, também só foi evidente pelo teste de ANOVA, cuja diferença significativa para o efeito tempo ($p<0,001$), o valor-p para o efeito Grupo e interação não foram significativos ($p=0,578$ e $p=0,900$, respectivamente). Na análise de *post hoc* para o efeito tempo, a comparação dois a dois, apresentou resultado significativo no 2º e 7º mês ($p=0,018$), e do 3º com todos os meses, exceto no 6º mês ($p<0,01$). Na comparação dos Grupos em cada mês de forma isolada não houve diferença significativa.

Já considerando as duas medidas de exploração (familiar *versus* novo), entre os Grupos e ao longo do tempo, foi possível verificar que há diferença significativa pelo teste de ANOVA para o tipo de exploração ($p<0,001$) e sua interação com o tempo ($p<0,001$), a interação com o Grupo e com o Grupo e tempo não foram significativas ($p=0,375$ e $p=0,254$, respectivamente). Na análise de *post hoc* a diferença significativa se deu nas seguintes comparações:

- Grupo DA: exploração do objeto familiar (2º mês) *versus* exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) ($p=0,013$ e $p<0,001$, respectivamente);
- Entre Grupo C: exploração do objeto familiar (3º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) ($p<0,001$);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto familiar (3º mês) *versus* exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) ($p=0,003$ e $p<0,001$, respectivamente);
- Entre Grupo C: exploração do objeto familiar (4º mês) com exploração do objeto novo no Grupo DA - (3º mês) ($p=0,002$);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto familiar (4º mês) com exploração do objeto novo no grupo DA - (3º mês) ($p=0,024$);
- Entre Grupo C: exploração do objeto familiar (5º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) ($p<0,001$);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto familiar (5º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) ($p=0,029$ e $p<0,001$, respectivamente);

- Entre Grupo C: exploração do objeto familiar (6º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p=0,010 e p<0,001, respectivamente);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto familiar (6º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p=0,049 e p=0,001, respectivamente);
- Entre Grupo C: exploração do objeto familiar (7º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p<0,001) e DA (2º mês, p=0,046);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto familiar (7º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p=0,003 e p<0,001, respectivamente);
- Entre Grupo C: exploração do objeto familiar (8º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p=0,002 e p<0,001, respectivamente);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto familiar (8º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p=0,010 e p<0,001, respectivamente);
- Entre Grupo C: exploração do objeto familiar (10º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p=0,006 e p<0,001, respectivamente);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto familiar (10º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p=0,002 e p<0,001, respectivamente);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto familiar (12º mês) com exploração do objeto novo no Grupo C e DA - (3º mês) (p=0,009 e p<0,001, respectivamente);
- Entre Grupo C: exploração do objeto novo (3º mês) com exploração do objeto novo no Grupo DA - (5º mês, p=0,005), grupo C e DA (7º, 8º e 10º mês, p<0,01);
- Entre Grupo DA: exploração do objeto novo (3º mês) com exploração do objeto novo no Grupo DA em todos os meses (p<0,01) e Grupo C (5º, 7º, 8º e 10º mês, p<0,01).



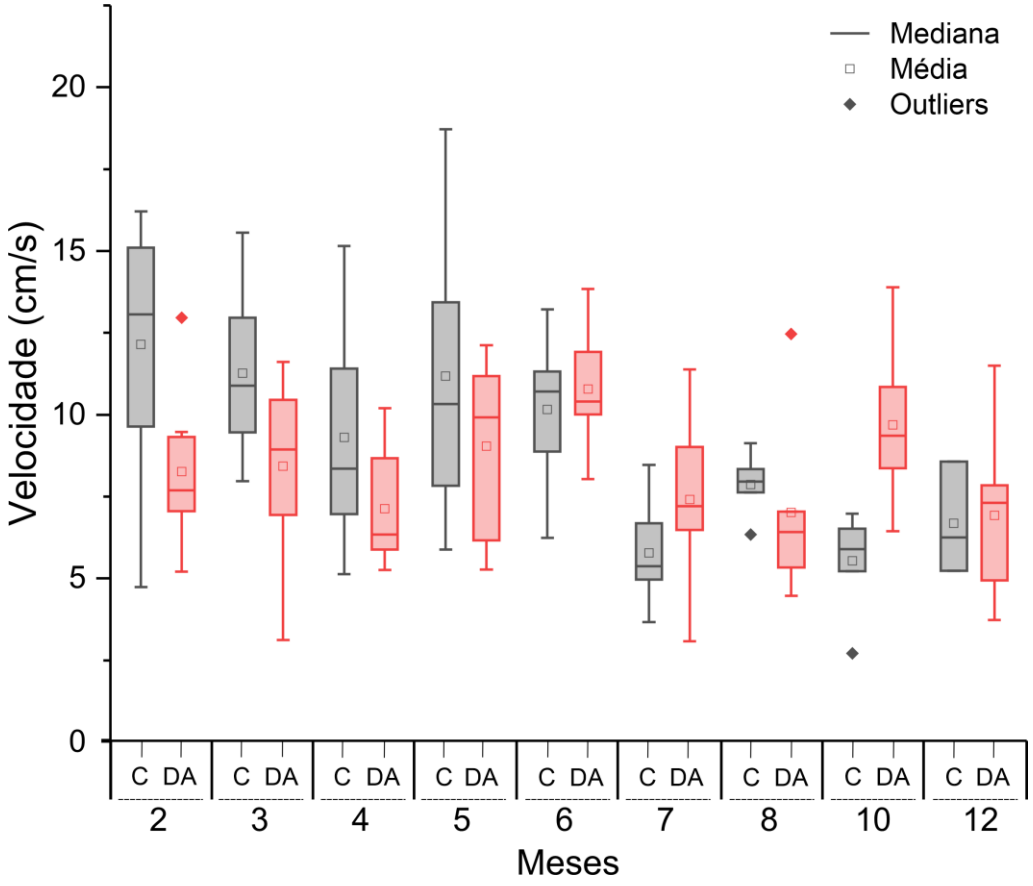
Foi considerado o tempo em segundos da exploração do objeto familiar (F, nas cores cinza e azul) e o objeto novo (N, nas cores vermelho e verde) dos Grupos Controle (C, cores cinza e vermelho) e de modelo de Doença de Alzheimer (DA, cores azul e verde). F: exploração do objeto familiar; N: exploração do objeto novo; C: Grupo Controle; DA: Grupo Doença de Alzheimer.

Figura 25. Exploração total do teste de reconhecimento do objeto novo ao longo de 12 meses

Na análise da velocidade de exploração dos Grupos ao longo do tempo (Figura 26), o teste de ANOVA mostrou diferença significativa para o efeito tempo e a interação tempo e Grupo ($p<0,001$), efeito Grupo não apresentou diferença significativa ($p=0,174$). Na análise de *post hoc* para o efeito tempo podemos verificar diferença significativa entre o 2º, 3º, 5º, 6º como 7º mês ($p<0,001$), no qual há um declínio significativo na visualização da figura 26, destes meses com o 7º mês.

Na Interação, as comparações dois a dois apresentaram diferença significativa do Grupo C no 2º mês com Grupo DA (4º, 7º e 8º mês; $p<0,01$) e C (7º e 10º mês; $p<0,001$), entre Grupo C no 3º mês com 7º e 10º mês ($p<0,002$), entre Grupo C no 5º mês com 7º e 10º mês ($p<0,003$) e Grupo DA no 12º mês ($p=0,045$), entre Grupo C no 6º mês com 7º mês ($p=0,027$) e entre Grupo DA no 6º mês com Grupo C no 7º e 10º mês ($p<0,010$).

Analisando a velocidade dos Grupos em cada tempo, verificamos que houve diferença significativa nos meses 2 (p=0,006), 3 (p=0,017) e 10 (p=0,002), mantendo inicialmente o Grupo DA com menor velocidade até o 5º mês em relação ao Grupo C e depois no 6 e 7º meses a velocidade do Grupo DA foi maior que o Grupo C e até o final alterando sem um padrão fixo.



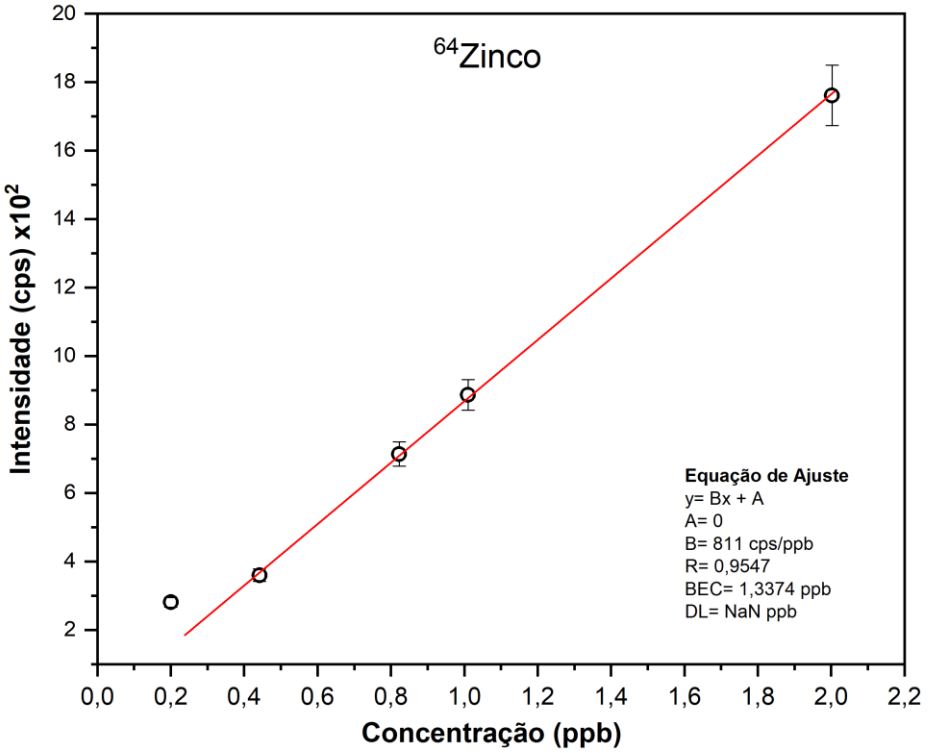
C: Grupo Controle; DA: Grupo Doença de Alzheimer.
Figura 26. Velocidade do teste de reconhecimento do objeto novo ao longo de 12 meses

3.3 Determinação dos oligoelementos em amostras de soro por ICP-MS

Para a determinação dos oligoelementos presentes em amostras de plasma sanguíneo, inicialmente foram estabelecidas curvas de calibração, visando a posterior quantificação de Cu, Zn e Se no plasma. As análises foram realizadas mensalmente, desde o segundo até o décimo segundo mês.

3.3.1 Obtenção da curva de calibração no processo de quantificação dos oligoelementos na amostra do plasma

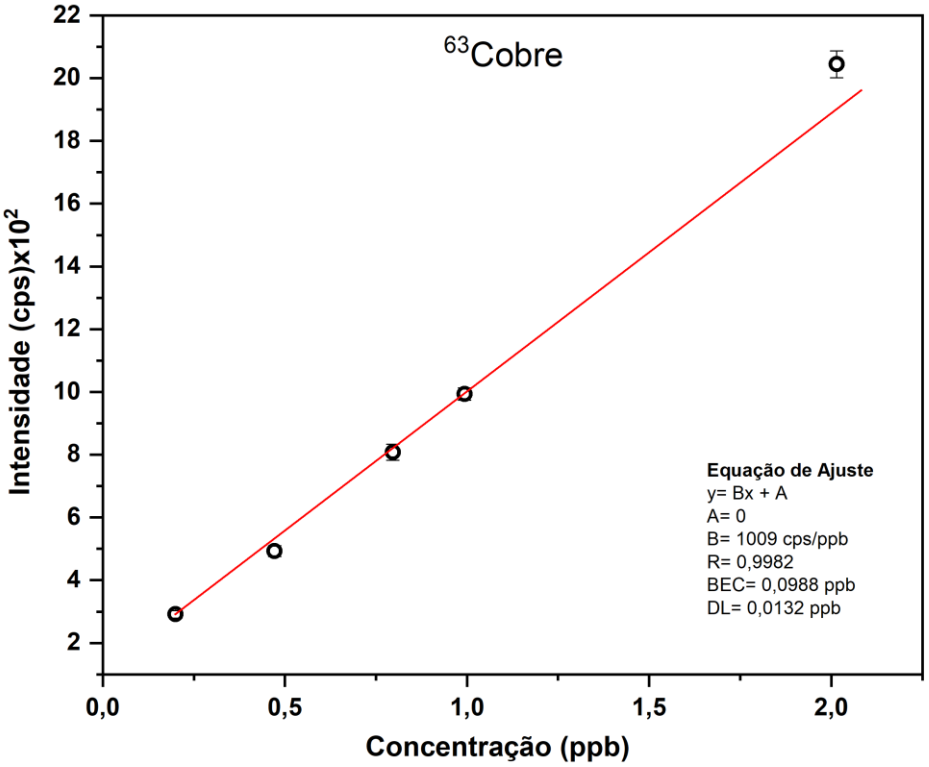
Para o processo de quantificação do oligoelemento Zn por ICP-MS, utilizando o isótopo ^{64}Zn foi obtida a curva de calibração como mostrada na figura 27. Os valores das intensidades do sinal em função da concentração foram ajustados à equação de uma reta que passa pela origem, assim o coeficiente linear é zero (A=0). Os parâmetros obtidos mediante o *software* Syngistix, R, BEC e LD, resultados do ajuste estão mostrados na tabela 5.



Y: intensidade do sinal; B: coeficiente angular; x: concentração; A: coeficiente linear; R: coeficiente de Pearson; BEC: concentração do sinal de fundo; DL: limite de detecção. A intensidade (em cps) em função da concentração (em ppb); os dados experimentais (círculos em cor preto) foram ajustados a uma reta (linha de cor vermelha)

Figura 27. Curva de calibração do zinco para o isótopo 64

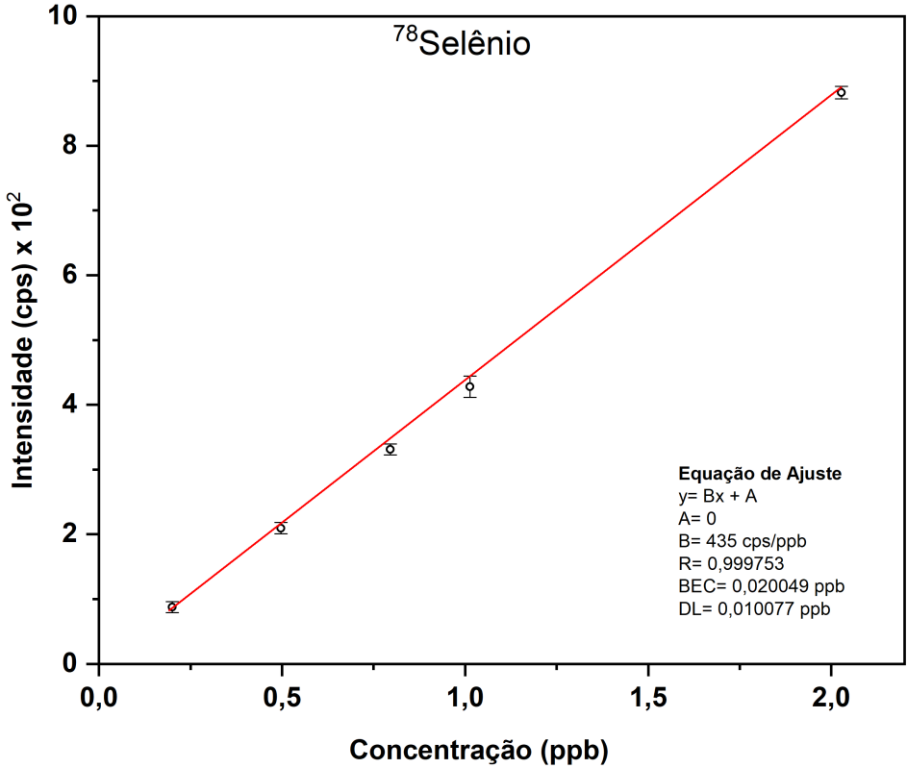
Para o processo de quantificação do elemento Cu por ICP-MS, foi utilizado o isótopo ^{63}Cu. Foi realizado de forma semelhante que o caso anterior a obtenção da curva de calibração como mostrada na figura 28.



Y: intensidade do sinal; B: coeficiente angular; x: concentração; A: coeficiente linear; R: coeficiente de Pearson; BEC: concentração do sinal de fundo; DL: limite de detecção. A intensidade (em cps) em função da concentração (em ppb); os dados experimentais (círculos em cor preto) foram ajustados a uma reta (linha de cor vermelha).

Figura 28. Curva de calibração do cobre para o isótopo 63

Para a quantificação do elemento Se por ICP-MS, foi utilizado exclusivamente o isótopo ^{78}Se. O processo de calibração seguiu uma abordagem semelhante aos casos anteriores. A curva de calibração foi obtida conforme os parâmetros estabelecidos. O resultado está apresentado na figura 29.



Y: intensidade do sinal; B: coeficiente angular; x: concentração; A: coeficiente linear; R: coeficiente de Pearson; BEC: concentração do sinal de fundo; DL: limite de detecção. A intensidade (em cps) em função da concentração (em ppb); os dados experimentais (círculos em cor preto) foram ajustados a uma reta (linha de cor vermelha) com a equação (y=Bx+A) que passa pela origem
Figura 29. Curva de calibração do selênio para o isótopo 78

A partir da obtenção das curvas de calibração foi elaborado a tabela 5 onde apresenta os parâmetros analíticos obtidos para os isótopos mais abundantes dos elementos Zn, Se e Cu, incluindo R, LD, LQ e BEC, todos expressos em ppb. Esses parâmetros são essenciais para avaliar a precisão e a confiabilidade das análises realizadas.

Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos para os isótopos dos elementos Zinco, Selênio e Cobre

Isótopo	R	LD (ppb)	LQ (ppb)	BEC (ppb)
^{64}Zn	0,9547	--	--	1,3374
^{78}Se	0,9997	0,0101	0,0333	0,0200
^{63}Cu	0,9982	0,0132	0,0436	0,0988

R: coeficiente de Pearson; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; BEC: concentração do sinal de fundo; ppb: partes por bilhão.

Para o isótopo ^{64}Zn, o valor de R foi inferior a 0,99 (0,9547), indicando uma baixa correlação entre a curva de calibração e os dados experimentais. Essa

limitação impossibilitou o cálculo dos valores de LD e LQ para esse isótopo, evidenciando a menor confiabilidade dos resultados de Zn. Além disso, o valor de BEC para ^{64}Zn foi superior a 1 ppb (1,3374 ppb), reforçando a inadequação da curva de calibração e sugerindo uma limitação na precisão das medições para esse isótopo.

Por outro lado, os isótopos ^{78}Se e ^{63}Cu apresentaram valores de R superiores a 0,99, indicando uma boa correlação entre as curvas de calibração e os dados experimentais. Para ^{78}Se, o valor de LD foi de 0,0101 ppb e o LQ de 0,0333 ppb, com um BEC de 0,0200 ppb, evidenciando alta precisão na quantificação de Se. Da mesma forma, para ^{63}Cu, os valores de LD, LQ e BEC foram de 0,0132 ppb, 0,0436 ppb e 0,0988 ppb, respectivamente, refletindo a confiabilidade nas medições de Cu.

Em resumo, após análise dos dados da tabela 5, os parâmetros analíticos indicam que os resultados para os isótopos de Se e Cu são confiáveis e precisos, permitindo quantificações robustas. Em contraste, os isótopos de Zn não apresentaram correlações adequadas na curva de calibração, resultando em dados de baixa confiabilidade para esses elementos. Assim, as concentrações de Zn precisam ser analisadas criteriosamente, enquanto as concentrações de Se e Cu podem ser consideradas confiáveis para análises detalhadas.

3.3.2 Quantificação dos oligoelementos na amostra do plasma mediante a técnica de ICP-MS

O oligoelemento ^{63}Cu apresentou um padrão de leve aumento da concentração ao longo dos 12 meses em ambos os Grupos, com médias maiores no Grupo DA, como pode ser visto na figura 30 no *boxplot* em vermelho e tabela 6. A diferença significativa ($p<0,05$) entre os Grupos, pela análise do teste *t* de Student, foi evidente em quase todos os tempos, com exceção dos meses 2, 5 e 8 (valor de p de 0,895, 0,054, 0,071, respectivamente), conforme pode ser visto na tabela 6.

Na avaliação longitudinal de cada Grupo, somente o Grupo DA apresentou diferença significativa no aumento da concentração ao longo dos 12 meses pelo teste e ANOVA ($p=0,003$), conforme pode ser visto na tabela 6. Pelo teste de *post hoc*, podemos observar que estas diferenças ocorrem entre as concentrações iniciais e finais, principalmente entre o 2º mês com os meses 3, 4, 7, 11 e 12 ($p<0,01$).

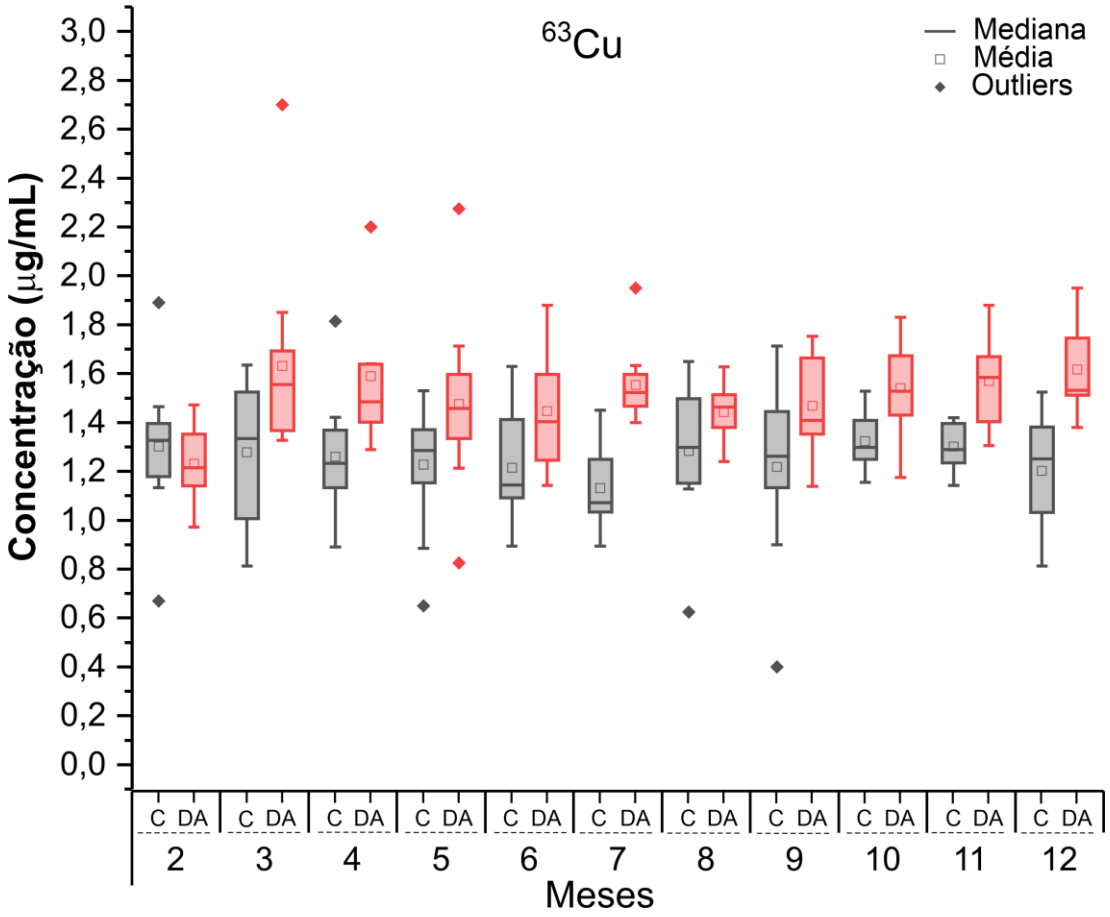


Figura 30. Análise da concentração de cobre ao longo dos 12 meses

Tabela 6. Descrição e resultado do teste *t* de Student da concentração de cobre entre os Grupos

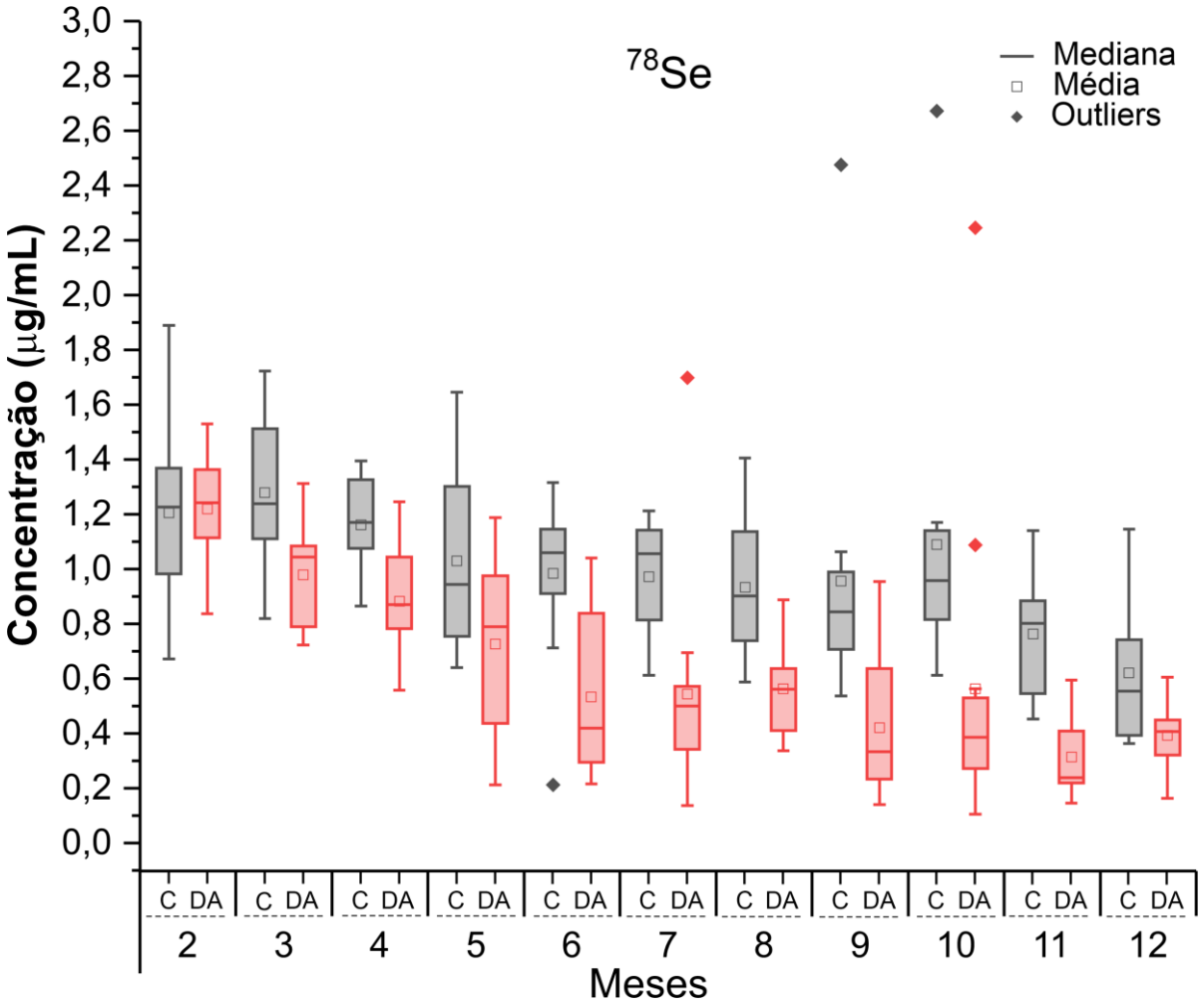
	Controle (µg/mL)		DA (µg/mL)		*t*-Student
Mês	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Valor-p**
2	1,302	0,279	1,231	0,143	0,440
3	1,278	0,290	1,632	0,375	0,017
4	1,259	0,233	1,590	0,303	0,007
5	1,228	0,249	1,476	0,341	0,054
6	1,214	0,219	1,446	0,241	0,022
7	1,132	0,183	1,554	0,146	<0,001
8	1,284	0,272	1,444	0,102	0,071
9	1,218	0,334	1,468	0,190	0,034
10	1,324	0,109	1,541	0,191	0,002
11	1,302	0,090	1,570	0,178	<0,001
12	1,203	0,235	1,617	0,173	<0,001
ANOVA Valor-p	0,744		0,003		

(^{63}Cu). Grupos Doença de Alzheimer e Grupo Controle em cada mês analisado e ao longo dos meses pelo teste de ANOVA.

Já no oligoelemento ^{78}Se foi observado um padrão de decaimento de concentração ao longo dos 12 meses de forma linear em ambos os Grupos, com médias

menores no Grupo DA, como pode ser visto na figura 31 no *boxplot* em vermelho e tabela 7. A diferença significativa entre os Grupos, pela análise do teste *t* de Student, foi evidente em quase todos os tempos, com exceção do mês 2 (p=0,895), conforme pode ser visto na tabela 7.

Na avaliação longitudinal de cada Grupo também mostrou diferença significativa no decaimento do sinal pelo teste e ANOVA (p<0,001). No Grupo DA o decaimento foi mais acentuado no início e pelo teste de *post hoc*, foi observado que as diferenças significativas (p<0,001) ocorreram entre o 2º mês com os meses 5 ao 12, 3º mês com os meses 6 a 12, 4º mês com 9, 10 e 12 meses, e entre 5º e 11 mês. Já no Grupo Controle, as diferenças significativas (p<0,001) pelo teste de *post hoc* foram menos evidentes e ocorreram principalmente entre a concentração de início com o fim, nas comparações entre os meses 2 e 3 com 11 e 12, e entre o mês 4 com o 12º mês.



C: Grupo Controle; DA: Grupo doença de Alzheimer.
Figura 31. Análise da concentração de selênio ao longo dos 12 meses

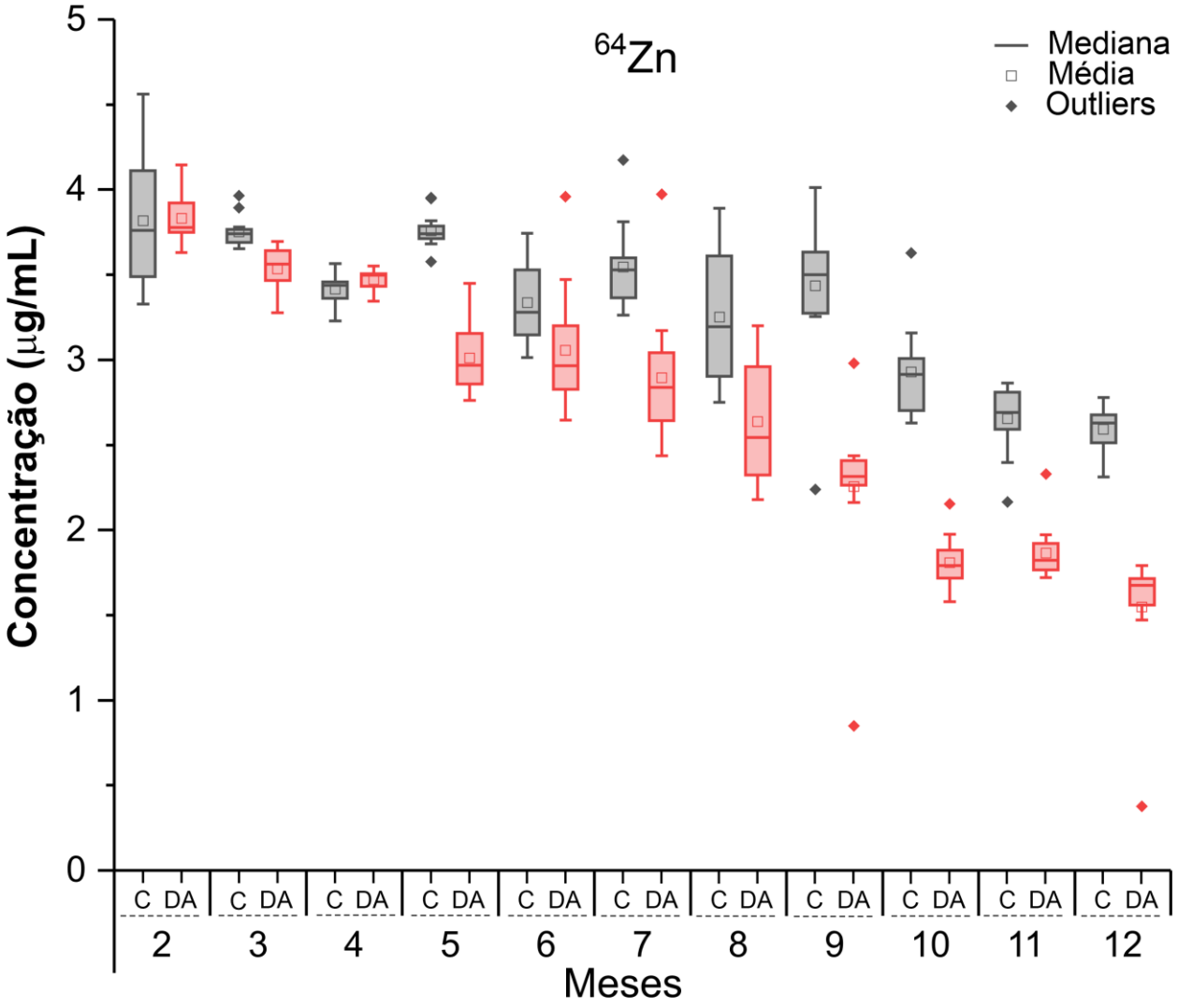
Tabela 7. Descrição e resultado do teste *t* de Student da concentração de selênio entre os Grupos

	Controle (μg/mL)		DA (μg/mL)		*t*-Student
Mês	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Valor-p**
2	1,205	0,312	1,220	0,214	0,895
3	1,278	0,274	0,979	0,196	0,006
4	1,161	0,170	0,883	0,194	0,001
5	1,029	0,327	0,727	0,324	0,033
6	0,984	0,290	0,532	0,295	0,001
7	0,971	0,209	0,544	0,402	0,004
8	0,933	0,259	0,563	0,170	<0,001
9	0,957	0,503	0,421	0,257	0,003
10	1,090	0,528	0,563	0,586	0,030
11	0,763	0,235	0,314	0,152	<0,001
12	0,621	0,281	0,393	0,118	0,016
ANOVA Valor-p	<0,001		<0,001		

(^{78}Se). Grupos Doença de Alzheimer e Grupo Controle em cada mês analisado e ao longo dos meses pelo teste de ANOVA.

O oligoelemento ^{64}Zn apresentou também um padrão decaimento de concentração ao longo dos 12 meses de avaliação em ambos os Grupos, com maior intensidade de constância no Grupo DA, como pode ser visto na figura 32 no *boxplot* em vermelho. Já no Grupo Controle o decaimento é menos acentuado e a diferença entre os Grupos pela análise do teste *t* de Student mostrou diferença significativa (p<0,001) em quase todos os tempos, com exceção dos meses 2 e 4 (p=0,890 e p=0,080, respectivamente), conforme pode ser visto na tabela 8.

Na avaliação longitudinal de cada Grupo também mostrou diferença significativa no decaimento do sinal pelo teste e ANOVA (p<0,001). No Grupo DA o decaimento foi mais acentuado no início e no final e pelo teste de *post hoc*, foi observado que as diferenças foram significativas (p<0,001) entre o 2º, 3º e 4º mês com o 5º ao 12º mês, já no 5º e 6º a diferença foi em relação do 8º ao 12º mês, no 7º mês foi em relação com 9º ao 12º mês, entre o 8º e 9º em relação ao 10º ao 12º mês, e no 9º em relação ao 10º e 12º mês. Já no Grupo Controle, as diferenças significativas (p<0,001) foram menos evidentes e ocorreram principalmente entre a concentração de início com o fim, como ao 2º ao 9º mês em relação aos 10º ao 12º e entre 2º ao 5º mês com o 6º e 8º mês, sendo que entre o 2º e 4º mês, também foi diferente pelo teste de *post hoc*.



C: Grupo Controle; DA: Grupo Doença de Alzheimer.
Figura 32. Análise da concentração de zinco ao longo dos 12 meses

Tabela 8. Descrição e resultado do teste *t* de Student da concentração de zinco entre os Grupos Doença de Alzheimer e Grupo Controle em cada mês analisado e ao longo dos meses pelo teste de ANOVA

	Controle (µg/mL)		DA (µg/mL)		*t*-Student
Mês	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Valor-p**
2	3,816	0,378	3,833	3,833	0,890
3	3,753	0,092	3,533	3,533	<0,001
4	3,415	0,085	3,471	3,471	0,080
5	3,758	0,105	3,011	3,011	<0,001
6	3,335	0,252	3,056	3,056	<0,001
7	3,544	0,252	2,895	2,895	<0,001
8	3,250	0,399	2,638	2,638	<0,001
9	3,435	0,445	2,254	2,254	<0,001
10	2,929	0,274	1,808	1,808	<0,001
11	2,655	0,203	1,866	1,866	<0,001
12	2,593	0,137	1,549	1,549	<0,001
ANOVA Valor-p	<0,001		<0,001		

(^{64}Zn). Grupos Doença de Alzheimer e Grupo Controle em cada mês analisado e ao longo dos meses pelo teste de ANOVA.

Assim a análise dos oligoelementos ^{63}Cu, ^{78}Se e ^{64}Zn no plasma revelou padrões distintos de variação ao longo de 12 meses entre os Grupos Controle e DA. O ^{63}Cu apresentou um aumento progressivo da concentração, com valores significativamente mais elevados no Grupo DA na maioria dos meses analisados ($p<0,05$), exceto nos meses 2, 5 e 8. A análise longitudinal indicou que apenas o Grupo DA exibiu um crescimento estatisticamente significativo ao longo do tempo (ANOVA, $p=0,003$), com diferenças mais evidentes entre os meses iniciais e finais. O ^{78}Se, por outro lado, demonstrou um padrão de decaimento linear ao longo do período, sendo mais acentuado no Grupo DA, onde a redução foi significativa desde os primeiros meses, conforme evidenciado pelo teste de *post hoc*.

No Grupo Controle, a diminuição da concentração foi menos pronunciada, com diferenças significativas apenas entre os meses iniciais e finais. O ^{64}Zn também apresentou um padrão de decaimento, com uma redução mais estável no Grupo DA, enquanto no Grupo Controle a variação foi menos acentuada. A análise estatística indicou diferenças significativas ($p<0,001$) entre os Grupos na maioria dos meses, com exceção dos meses 2 e 4. No Grupo DA, o declínio da concentração foi mais expressivo tanto no início quanto no final do período de acompanhamento, enquanto no Grupo Controle a queda foi observada principalmente entre os meses iniciais e finais. Esses achados sugerem que alterações nos níveis de ^{63}Cu, ^{78}Se e ^{64}Zn podem estar associadas à progressão da DA, evidenciando potenciais biomarcadores para monitoramento da doença.

3.4 Avaliação dos níveis do peptídeo Aβ no sistema nervoso central, mediante a técnica de imunohistoquímica

A imunohistoquímica revelou intensa deposição de β-amiloide no SNC ao longo do tempo, evidenciando imunomarcação intracitoplasmática nos corpos celulares de neurônios piramidais do córtex encefálico e seus prolongamentos dendríticos. Adicionalmente, depósitos extracelulares irregulares, compatíveis com placas de β-amiloide, foram identificados na substância cinzenta e branca. Esses depósitos, indicados pelas setas na figura 33, marcam a progressão da doença nos animais transgênicos avaliados.

Nos primeiros meses, a marcação foi moderada. No 2º mês (Figura 33, A1-A3), observou-se imunomarcação moderada e multifocal nos neurônios, com depósitos extracelulares menos evidentes. No 3º mês (Figura 33, B1-B3), a marcação também foi moderada, mas com focos restritos, indicando que o acúmulo de β-amiloide ainda estava em estágios iniciais.

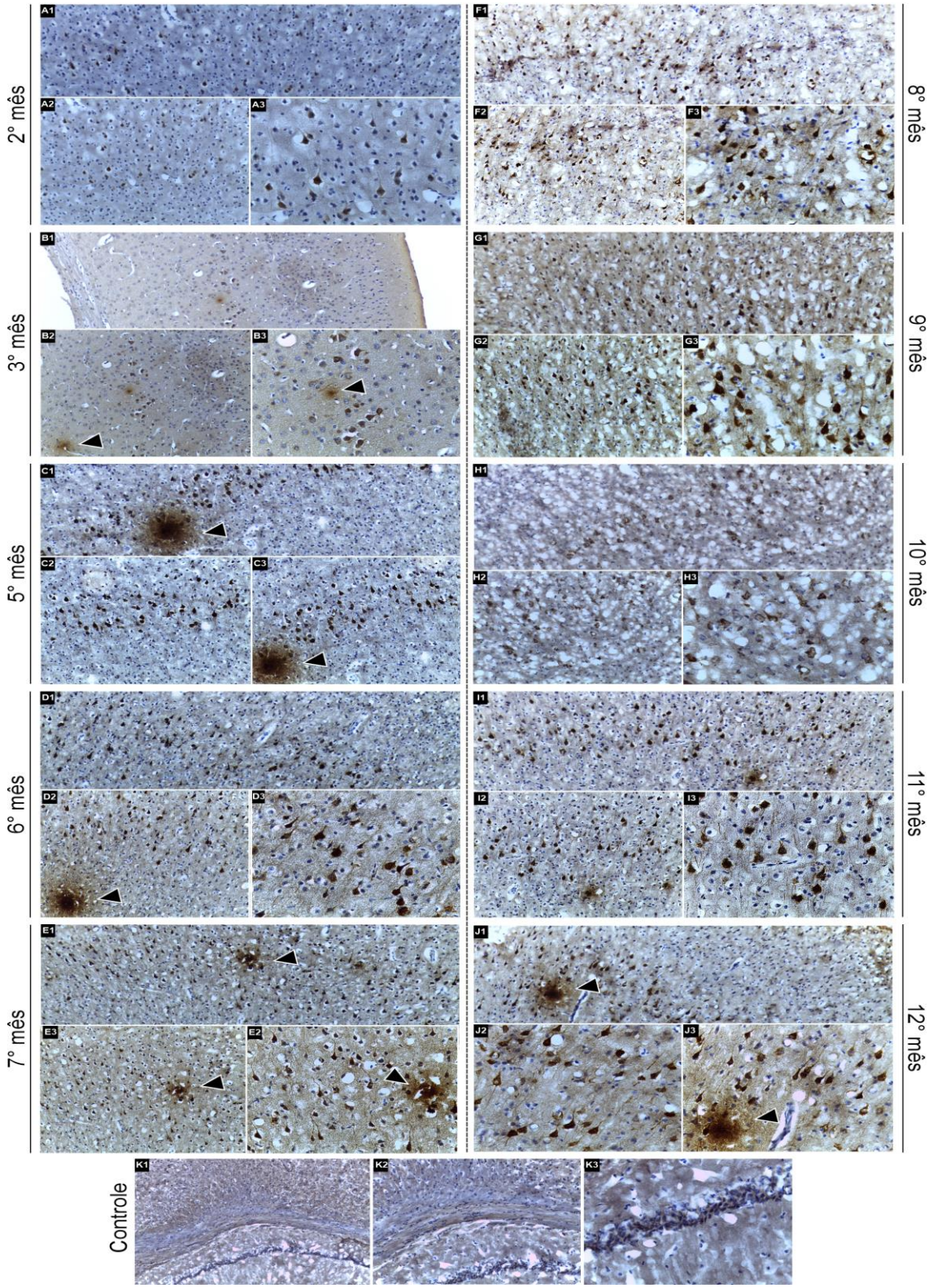
A partir do 5º mês (Figura 33, C1-C3), a imunomarcação se intensificou, tornando-se acentuada e multifocal nos corpos neuronais, acompanhada de depósitos extracelulares bem definidos. Nos 6º e 7º meses (Figura 33, D1-D3 e E1-E3), os depósitos extracelulares aumentaram em distribuição e densidade, enquanto a marcação permaneceu acentuada, exibindo tanto padrões multifocais quanto difusos.

Entre o 8º e o 12º mês (Figura 33, F1-F3, G1-G3, H1-H3, I1-I3, J1-J3), a imunomarcação atingiu seu ápice, com depósitos extracelulares amplamente distribuídos e uma marcação acentuada e persistente nos neurônios piramidais. Esse padrão reflete a progressão contínua do acúmulo de β-amiloide ao longo do tempo.

Nos animais do Grupo Controle (C57BL/6), observou-se ausência de marcação intracelular e depósitos extracelulares significativos em todos os tempos avaliados, do 2º ao 12º mês. Para representar as características consistentes desses controles ao longo do período, foram incluídas imagens representativas destacadas como K1, K2 e K3 na figura 33. Essas imagens confirmam a ausência de deposição significativa de β-amiloide nos animais do Grupo Controle, reforçando o impacto da transgenia nos animais com DA.

A análise detalhada apresentada na figura 33 demonstra que as alterações mais significativas começaram a partir do 5º mês, enquanto no 2º mês as diferenças entre os Grupos não foram relevantes. A presença de β-amiloide, indicada pelas setas, reforça a progressão do acúmulo dessa proteína e sua contribuição para o comprometimento funcional e estrutural do SNC em modelos transgênicos de DA.

Na figura 33, as imagens identificadas como (A-K)1, (A-K)2 e (A-K)3 foram obtidas com aumento de 100x, 200x e 400x, respectivamente.



A imunomarcação intracitoplasmática é observada nos corpos celulares de neurônios piramidais e seus prolongamentos dendríticos, enquanto os depósitos extracelulares (indicados pelas setas z) estão distribuídos de forma irregular na substância cinzenta e branca. Os painéis (A1-A3) representam o 2º mês, os painéis (B1-B3) o 3º mês, os painéis (C1-C3) o 5º mês, os painéis (D1-D3) o 6º mês, e assim sucessivamente até os painéis (J1-J3), que representam o 12º mês. O Grupo Controle (C57BL/6) apresentou ausência de imunomarcação intracelular e depósitos extracelulares em todos os períodos avaliados. Para representar essas características consistentes nos Grupos Controle, foram incluídas imagens representativas destacadas como (K1-K3).

Figura 33. Imunomarcação de β-amiloide no córtex encefálico de animais transgênicos 3xTg-AD em diferentes períodos experimentais

4 DISCUSSÃO

Primeiramente, da avaliação da influência do período do dia (manhã e tarde) e do sexo dos animais em diferentes parâmetros comportamentais, considerando as variações circadianas que podem impactar tanto o comportamento locomotor quanto cognitivo. Diversas técnicas foram utilizadas, incluindo o teste de locomoção horizontal e vertical, o TRO e LAM, para analisar como o horário e o sexo interagem para moldar os resultados.

Na avaliação da locomoção espontânea, foi realizada uma análise mais detalhada em comparação com a abordagem tradicional de avaliar a locomoção total no teste de campo aberto.[131-133] Tanto os movimentos horizontais quanto os verticais foram avaliados, incluindo suas variações de velocidade (lenta e rápida). No geral, diferenças significativas entre os sexos foram observadas apenas nos movimentos rápidos (horizontais e verticais). Nos movimentos rápidos horizontais, essas diferenças foram significativas nos dias 7 e 14, enquanto nos movimentos rápidos verticais, foram observadas em todas as sessões, com as fêmeas mostrando consistentemente uma maior predominância de movimentos em comparação com os machos.

Kokras et al.[134] também demonstraram que ratas Wistar adultas exibem frequências mais altas de movimentos horizontais e verticais tanto em estados de Controle quanto após a administração de veículo, bem como em condições experimentais envolvendo o uso de ansiolíticos e antidepressivos.[134] Na avaliação da locomoção exploratória antes do teste de memória, ratas Long Evans adultas foram significativamente mais ativas e rápidas do que os machos,[135] apoiando nossos achados. Além disso, outro estudo que avaliou os efeitos do sexo biológico, condições de habitação e hora do dia sobre a motivação social encontrou que as ratas obtiveram mais recompensas sociais, exibiram maior atividade, latências mais curtas para iniciar ações e mais locomoção do que os machos.[136]

Outro aspecto interessante avaliado, embora sem significância estatística, foi a influência do período de teste (manhã ou tarde) nos movimentos rápidos horizontais, em que a escala da diferença na frequência de movimento foi muito mais pronunciada. Em todas as sessões analisadas, as fêmeas mostraram maior atividade pela manhã, enquanto os machos exibiram maior atividade à tarde. Esse padrão pode ser atribuído à influência de hormônios como o estrogênio, que é conhecido por modular

a atividade locomotora em roedores, particularmente durante fases de maior alerta circadiano.[137]

Essa observação está alinhada com os achados de outros estudos, como os de Marczinski et al.[138] Armijo et al.[139] que também relataram aumento da atividade locomotora em fêmeas durante períodos específicos do ciclo circadiano. Essa atividade aumentada provavelmente é influenciada por diferenças hormonais e metabólicas, particularmente pelos níveis flutuantes de corticosterona e estrogênio.[140] Padrões comportamentais semelhantes foram observados em camundongos adultos C57BL/6, onde as fêmeas exibiram maior atividade motora pela manhã, enquanto os machos foram mais ativos à noite. Esses achados, consistentes em diferentes idades e origens genéticas em camundongos, reforçam ainda mais a robustez dessas observações.[141]

A avaliação motora é amplamente utilizada para monitorar o comportamento motor, particularmente em análises longitudinais. Em nosso estudo, realizamos essa avaliação semanalmente, mas não identificamos diferenças significativas nas medidas avaliadas ou sinais de um padrão de habituação. Esses resultados sugerem que o intervalo temporal adotado pode ser apropriado para sustentar a manutenção de comportamento contínuo sem induzir estresse ou desmotivação relacionada à habituação.

O teste de objeto novo mostrou diferenças significativas nos efeitos do tempo sobre os parâmetros de IR e velocidade média. Notavelmente, um IR maior foi observado pela manhã, o que pode ser explicado pela maior motivação dos ratos para reunir informações sobre o ambiente. Além disso, os resultados exibiram maior velocidade à tarde. Esse achado apoia a teoria de maior atividade durante a fase escura, conforme relatado por Nelson et al. e Takahashi et al.[127,142] Quanto ao tipo de exploração, o objeto novo foi significativamente mais explorado do que o objeto familiar, especialmente pelas fêmeas pela manhã. Esse padrão também foi observado em outro estudo no Grupo Controle, embora sem diferenças estatisticamente significativas.[143] Por outro lado, o efeito do sexo não mostrou diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados, o que está alinhado com a maioria dos artigos incluídos em uma revisão.[144]

No teste de LAM, a latência para encontrar a plataforma não variou significativamente em relação ao sexo ou hora do dia. No entanto, observou-se que as fêmeas demoraram mais do que os machos para localizar a plataforma à tarde. O estudo

de Zorzo et al.[145] também não encontrou diferenças significativas na latência entre os gêneros, mas as fêmeas exibiram valores de latência mais altos do que os machos. Além disso, neste mesmo estudo, a velocidade para encontrar a plataforma foi avaliada, e os resultados corroboraram os nossos, mostrando que as fêmeas foram mais rápidas do que os machos, especialmente à tarde.

No entanto, nosso estudo encontrou que o parâmetro de velocidade foi significativo em relação ao efeito do tempo, com ambos os sexos mostrando maior velocidade pela manhã. Esse resultado sugere que a motivação para escapar da água, um estímulo aversivo, pode ser mais pronunciada durante a fase de alerta dos roedores, conforme discutido por Valentinuzzi et al.[146] Para esse teste, houve uma análise cuidadosa que levou à redução nas estatísticas finais ao remover os 2 animais que não encontraram a plataforma durante os 60 segundos do teste.

Quanto à avaliação espacial da estratégia de navegação no teste LAM por quadrantes, foi observada uma diferença significativa no tempo gasto em cada quadrante, particularmente no que continha a plataforma (SE) em comparação aos outros. Além disso, houve maior exploração do quadrante inicial do teste em relação aos outros. Esse padrão também foi relatado em estudos anteriores.[145,147] Embora não significativo, os machos encontraram a plataforma mais rápido do que as fêmeas e tiveram mais estratégia de navegação, mostrando um tempo maior gasto no quadrante alvo em comparação com as fêmeas, resultado que também foi evidenciado em outros estudos.[145,148]

A hora do dia na avaliação comportamental de roedores é um fator biológico relevante que é frequentemente negligenciado na descrição dos estudos em pesquisa pré-clínica. A variação no momento da aplicação dos testes comportamentais pode influenciar significativamente os resultados, pois mesmo durante a fase de luz, o comportamento animal pode variar entre manhã e tarde, como observado em alguns parâmetros de nosso estudo. Além disso, o sexo foi identificado como o fator biológico mais relevante na variação comportamental.

Esses resultados reforçam a importância de entender quais aspectos comportamentais são mais afetados pela hora do dia, além do impacto do ciclo circadiano e do sexo nos desenhos experimentais. Essa compreensão é essencial para ajustar os protocolos experimentais de acordo com as variáveis mais relevantes. A falta de padronização nos horários dos testes pode contribuir para inconsistências entre os estudos, conforme apontado por Nelson et al.[149] e Valentinuzzi et al.[146] estratégias

experimentais, como inverter o ciclo de luz, podem alinhar os horários dos testes com as fases ativas dos animais, garantindo maior precisão nos resultados e reprodutibilidade da pesquisa comportamental.

Esses fatores destacam a necessidade de uma abordagem cuidadosa ao planejar experimentos com roedores, considerando não apenas o ambiente e a dieta, mas também as características intrínsecas dos animais, como o comportamento noturno e a sensibilidade ao tempo. Entender esses aspectos pode melhorar significativamente a qualidade e a confiabilidade dos dados obtidos em estudos pré-clínicos.

Após determinar que o período (matutino e vespertino) influencia o comportamento, foi realizada a avaliação comportamental no período matutino para o estudo da DA. A avaliação comportamental nos camundongos transgênicos 3xTg-AD utilizou três testes principais para investigar alterações associadas à DA: locomoção espontânea (habituação em campo aberto), memória espacial (LAM) e memória episódica (TRO). Esses testes são amplamente validados e frequentemente utilizados para identificar alterações comportamentais e cognitivas em modelos de Alzheimer.[123,150,151]

A análise dos resultados de locomoção espontânea em campo aberto revelou diferenças significativas entre os camundongos transgênicos (Grupo DA) e os controles (Grupo Controle). Os animais DA apresentaram maior atividade locomotora, tanto nos movimentos verticais quanto horizontais, especialmente nos primeiros meses (2 a 6 meses). Esse padrão de hiperatividade inicial sugere alterações no controle motor e dopaminérgico, frequentemente associadas à progressão inicial da DA.[150,152] Esses achados são consistentes com os dados neuropatológicos observados no modelo 3xTg-AD, que revelam depósitos iniciais de Aβ intracelular ao redor do terceiro mês de vida, com progressão evidente após o quarto mês. Essa correlação entre alterações neuropatológicas e padrões comportamentais reforça a validade do modelo para estudar os estágios iniciais da doença.[153,154]

Os movimentos horizontais rápidos também foram mais frequentes nos camundongos DA nos estágios iniciais, sugerindo maior exploração do ambiente. Esse comportamento pode ser explicado como uma resposta compensatória inicial do SNC às alterações neuropatológicas. Estudos mostram que o aumento da atividade locomotora nos primeiros meses pode refletir mecanismos de compensação neural antes do surgimento de déficits motores e cognitivos mais avançados, associados ao acúmulo de placas extracelulares e tau hiperfosforilada nos estágios posteriores.[150,155] Já os

movimentos lentos, tanto verticais quanto horizontais, apresentaram maior frequência relativa nos camundongos transgênicos para DA em comparação aos Grupos Controles, sugerindo uma combinação de ansiedade e exploração excessiva, frequentemente associada a disfunções hipocampais.[156]

No LAM, os camundongos transgênicos apresentaram déficits na memória espacial progressivamente mais evidentes ao longo do experimento. Embora a latência para encontrar a plataforma não tenha mostrado diferenças significativas nos estágios iniciais, essa latência aumentou a partir do quarto mês, coincidindo com a progressão neuropatológica descrita no modelo, como a presença de placas extracelulares e tau hiperfosforilada no hipocampo e no córtex.[150,153,157] Esses achados refletem a disfunção progressiva do hipocampo, uma área chave na memória espacial frequentemente afetada em estágios iniciais da DA.

No TRO, o índice de reconhecimento foi reduzido nos camundongos DA em comparação aos Controles, especialmente após os primeiros meses. Inicialmente, os animais DA foram capazes de discriminar entre o objeto familiar e o novo, mas essa capacidade diminuiu gradualmente, refletindo déficits na memória episódica e alterações na plasticidade sináptica. Esses resultados coincidem com os achados neuropatológicos que indicam o surgimento de tau hiperfosforilada e sua evolução para NFTs a partir do sexto mês, marcando uma piora progressiva na capacidade cognitiva.[149,150,155]

Esses resultados confirmam alterações comportamentais e cognitivas específicas nos camundongos transgênicos 3xTg-AD, que refletem as características progressivas da DA. A hiperatividade inicial observada em associação com depósitos intracelulares de Aβ, combinada com déficits progressivos na memória espacial e episódica correlacionados ao avanço das alterações de tau, reforça a relevância deste modelo para o estudo dos mecanismos subjacentes à neurodegeneração e para a investigação de intervenções terapêuticas direcionadas.

A quantificação dos oligoelementos Cu, Zn e Se mensurado pela técnica de ICP-MS revelou padrões distintos de variação ao longo de 12 meses entre os Grupos Controle e de pacientes com DA, utilizando amostras de soro de animais transgênicos 3xTg-AD. No entanto, apenas no segundo mês de avaliação não foram observadas diferenças significativas entre os Grupos, sugerindo que a progressão da doença influencia a alteração na homeostase desses elementos. [66,80,158-160]

O Cu apresentou um aumento progressivo da concentração plasmática ao longo do tempo, sendo significativamente maior no Grupo DA na maioria dos meses analisados, padrão também reportado em outros estudos. [66,79,159-166] Esse aumento pode estar relacionado à disfunção no transporte de Cu devido à alteração na expressão da ATP7B, o que resulta na elevação do Cu não ligado à ceruloplasmina.[80] Esse Cu livre tem alta capacidade catalítica para reações redox, promovendo a formação de EROS, aumentando o estresse oxidativo e contribuindo para a formação de agregados de Aβ.[160,161] O depósito de Cu em placas Aβ no tecido cerebral também pode resultar em uma redistribuição do metal, contribuindo para sua elevação no soro.[164]

No entanto, o Se demonstrou um padrão de decaimento linear ao longo do período, sendo a redução mais acentuada no Grupo DA. O decaimento é semelhante aos resultados encontrados na literatura.[159,166-171] Apenas no segundo mês as diferenças entre os Grupos não foram estatisticamente significativas, mas, com a progressão da doença, a queda na concentração de Se se tornou evidente. O Se tem um papel fundamental na defesa antioxidante neuronal, sendo um cofator essencial da GSH peroxidase, que protege as células contra o estresse oxidativo.[159] Sua redução em pacientes com DA pode estar associada ao aumento do dano oxidativo e à perda neuronal observada na doença.[79] Estudos indicam que níveis reduzidos de Se estão correlacionados com declínio cognitivo e maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo, o que pode acelerar a neurodegeneração.[162,171]

Já, para o caso do Zn também apresentou um padrão de declínio, com uma redução mais pronunciada no Grupo DA, como mostrado na literatura.[159,160,162,164,167,172] No segundo mês, as diferenças entre os Grupos não foram estatisticamente significativas, mas, a partir do terceiro mês, a redução dos níveis de Zn no Grupo DA tornou-se mais evidente ao longo do tempo. O Zn tem um papel essencial na sinalização sináptica e na regulação da estrutura proteica, sendo fundamental para a estabilização de agregados de Aβ. Sua redução pode estar associada a alterações na função sináptica e ao comprometimento da plasticidade neuronal.[160,172] Estudos sugerem que níveis mais baixos de Zn plasmático estão associados a um aumento do estresse oxidativo e à exacerbação da neurodegeneração.[66] Além disso, a interação do Zn com a proteína tau pode influenciar o desenvolvimento de neurofibrilas características da DA.[161]

Os resultados encontrados confirmam a desregulação da homeostase dos metais na DA e reforçam seu potencial como biomarcadores para monitoramento da

progressão da doença. A elevação do Cu sérico e a redução dos níveis de Se e Zn podem desempenhar papéis fundamentais na fisiopatologia da DA, contribuindo para alterações oxidativas e neuroinflamatórias.[159,164]

A análise imunohistoquímica realizada no presente estudo revelou intensa deposição de Aβ no SNC dos camundongos transgênicos 3xTg-AD, com progressão temporal evidente. Esses resultados corroboram a literatura, que descreve o modelo 3xTg-AD como amplamente utilizado para estudar a patologia da DA, devido às mutações nos genes APP, PS1 e tau, que permitem a formação de lesões características da doença, como depósitos de Aβ e NFTs de tau hiperfosforilada.[117] A marcação positiva para o anticorpo específico para o peptídeo foi observada a partir dos 3 meses de idade, indicando o início precoce do acúmulo de Aβ.

Dentre os eventos patológicos mais estudados, o acúmulo de Aβ no cérebro tem sido associado ao início e à progressão da doença, e sua marcação positiva nesses camundongos tem mostrado variações temporais importantes, refletindo a progressão do quadro neurodegenerativo.[106,173,174]

A formação de depósitos amiloides segue um padrão temporal, com surgimento inicial por volta dos 4-6 meses e maior intensidade entre os 9-12 meses de idade.[175,176] Esses achados foram replicados no presente estudo, que demonstrou imunomarcação moderada nos primeiros meses, com intensificação progressiva da deposição de Aβ ao longo do tempo. A partir do 5º mês, observou-se uma marcação acentuada, acompanhada de depósitos extracelulares bem definidos, indicando o avanço do processo patológico.

As alterações observadas ao longo do tempo refletem a dinâmica de deposição e agregação dos peptídeos Aβ, com evolução de pequenos depósitos difusos para placas compactas em estágios mais avançados da doença. Estudos como o de Ashe e Zahs,[177] sugerem que o crescimento das placas amiloides está intimamente associado à neuroinflamação, um processo que pode contribuir para a neurodegeneração nos modelos de DA. Além disso, a modulação temporal do acúmulo de Aβ em camundongos 3xTg-AD é influenciada pela interação entre a produção exacerbada do peptídeo, devido às mutações nos genes APP e PS1, e a capacidade limitada de eliminação, característica desse modelo.[178]

O impacto da deposição de Aβ no SNC vai além da formação de placas, afetando a transmissão sináptica e contribuindo para déficits cognitivos progressivos, como demonstrado por Jucker e Walker.[179] Esses achados reforçam a

relação entre o acúmulo de Aβ e a disfunção sináptica, uma característica marcante da DA.

A análise realizada por Mastrangelo et al.[173] destaca ainda que a progressão da carga de placas de Aβ é acompanhada por outras alterações neuropatológicas, como a gliose e a formação de emaranhados de tau, que interagem de forma sinérgica para agravar a degeneração neuronal. O presente estudo também identificou que o acúmulo de Aβ é mais acentuado em regiões críticas, como o córtex e o hipocampo, regiões associadas à memória e cognição.

Além disso, a interação entre Aβ e tau, amplamente descrita na literatura, parece desempenhar um papel crítico na facilitação da progressão da doença. O acúmulo de Aβ precede o aumento da tau em estágios iniciais, mas em fases avançadas, essas duas patologias interagem de maneira sinérgica, exacerbando a degeneração neuronal.[173,176,180]

5 CONCLUSÕES

1. Os resultados deste estudo destacaram a relevância dos oligoelementos como candidatos promissores a biomarcadores da doença de Alzheimer, permitindo a identificação precoce de alterações relacionadas à progressão da doença. A partir do terceiro mês de vida dos camundongos 3xTg-AD, foram observadas diferenças significativas entre os Grupos Controle e transgênico nos níveis séricos de cobre, zinco e selênio, corroborando a desregulação da homeostase metálica como característica marcante da patologia. O aumento progressivo do cobre e a redução do zinco e do selênio estão associados a alterações oxidativas e neuroinflamatórias que contribuem para o avanço do quadro neurodegenerativo;

2. Os testes comportamentais realizados evidenciaram alterações significativas na locomoção espontânea, memória espacial e memória episódica ao longo do tempo, refletindo os estágios iniciais e avançados da doença de Alzheimer. Os déficits cognitivos observados foram acompanhados pela progressão neuropatológica, confirmada pela imunohistoquímica, que revelou intensa deposição de β-amiloide intracelular e extracelular no sistema nervoso central. A partir do quinto mês, as placas de β-amiloide se tornaram mais definidas, indicando um avanço significativo no processo patológico;

3. Esses achados reforçam a validade do modelo 3xTg-AD para estudos da doença de Alzheimer, permitindo a correlação entre alterações comportamentais, neuroquímicas e neuropatológicas. A quantificação dos oligoelementos, associada a testes comportamentais e análises histológicas, fornece uma abordagem robusta para o monitoramento da progressão da doença de Alzheimer e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas. Portanto, este estudo contribui para o avanço no entendimento dos mecanismos subjacentes à doença de Alzheimer e no estabelecimento de biomarcadores séricos como ferramentas úteis no diagnóstico e no acompanhamento da doença.

6 REFERÊNCIAS

1. Gustavsson A, Norton N, Fast T, Frölich L, Georges J, Holzapfel D, et al. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. Alzheimer's & Dementia. 2023;19(2):658-70.

2. Schaier M, Hermann G, Koellensperger G, Theiner S. Accurate characterization of β-amyloid (Aβ40, Aβ42) standards using species-specific isotope dilution by means of HPLC-ICP-MS/MS. Anal Bioanal Chem. 2022;414(1):639-48.

3. 2024 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement. 2024;20(5):3708-821.

4. GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet Public Health. 2022;7(2):e105-e25.

5. Xia Z-D, Ma R-X, Wen J-F, Zhai Y-F, Wang Y-Q, Wang F-Y, et al. Pathogenesis, Animal Models, and Drug Discovery of Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimer's Disease. 2023;94(4):1265-301.

6. Hernandez F, Lucas JJ, Avila J, Sorensen A, Avila J, Hernandez F, et al. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2013;33(Suppl 1):S141-4.

7. Galimberti D, Scarpini E. Progress in Alzheimer's disease. J Neurol. 2012;259(2):201-11.

8. Balasa M, Gelpi E, Antonell A, Rey MJ, Sánchez-Valle R, Molinuevo JL, et al.; Neurological Tissue Bank/University of Barcelona/Hospital Clínic NTB/UB/HC Collaborative Group. Clinical features and APOE genotype of pathologically proven early-onset Alzheimer disease. Neurology. 2011;76(20):1720-5.

9. Abdulkadir TS, Ayo JO. Pathophysiology of Alzheimer's disease: an insight into the genetic factors, hypotheses, redox imbalance, and antioxidant intervention. Comp Clin Pathol. 2024;33(5):811–21.

10. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. The Lancet. 2021;397(10284):1577-90.

11. Conserva GN. Efeitos do treinamento de memória autobiográfica em indivíduos com doença de alzheimer: uma revisão sistemática [tese]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2021. 61 f.

12. Talmelli LFdS, Vale FdACd, Gratão ACM, Kusumota L, Rodrigues RAP. Doença de Alzheimer: declínio funcional e estágio da demência. Acta Paul Enferm. 2013;26(3):219–25.

13. Kim J, Jeong M, Stiles WR, Choi HS. Neuroimaging Modalities in Alzheimer's Disease: Diagnosis and Clinical Features. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(11):6079.

14. Oliveira Junior PP. Medida da espessura cortical com imagens de ressonância magnética: técnica e aplicações na doença de Alzheimer e na polimicrogiria [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

15. Murphy MP, LeVine H 3rd. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. J Alzheimers Dis. 2010;19(1):311-23.

16. Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85(13):4884-8.

17. Chafi AH, Hauw JJ, Rancurel G, Berry JP, Galle C. Absence of aluminium in Alzheimer's disease brain tissue: electron microprobe and ion microprobe studies. Neurosci Lett. 1991;123(1):61-4.

18. Tabaton M, Piccini A. Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Int J Exp Pathol. 2005;86(3):139-45.

19. Brown CE, Dyck RH. Experience-dependent regulation of synaptic zinc is impaired in the cortex of aged mice. Neuroscience. 2003;119(3):795-801.

20. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. Molecules. 2020;25(24):5789.

21. Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. J Prev Alzheimers Dis. 2021;8(3):313-21.

22. Kinoshita D. Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a doença de Alzheimer [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.

23. Twarowski B, Herbet M. Inflammatory processes in Alzheimer's disease-pathomechanism, diagnosis and treatment: a review. Int J Mol Sci. 2023;24(7):6518.

24. Gouras GK, Olsson TT, Hansson O. β-Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. Neurotherapeutics. 2015;12(1):3-11.

25. Patterson C, Feightner JW, Garcia A, Hsiung GY, MacKnight C, Sadovnick AD. Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. Cmaj. 2008;178(5):548-56.

26. Commins S, Kirby BP. The complexities of behavioural assessment in neurodegenerative disorders: A focus on Alzheimer's disease. Pharmacol Res. 2019;147:104363.

27. Lee JC, Kim SJ, Hong S, Kim Y. Diagnosis of Alzheimer's disease utilizing amyloid and tau as fluid biomarkers. Exp Mol Med. 2019;51(5):1-10.

28. Roberts BR, Ryan TM, Bush AI, Masters CL, Duce JA. The role of metallobiology and amyloid-beta peptides in Alzheimer's disease. J Neurochem. 2012;120(Suppl 1):149-66.

29. Wippold FJ, 2nd, Cairns N, Vo K, Holtzman DM, Morris JC. Neuropathology for the neuroradiologist: plaques and tangles. AJNR Am J Neuroradiol. 2008;29(1):18-22.

30. Michalke B, Nischwitz V. Review on metal speciation analysis in cerebrospinal fluid-current methods and results: a review. Anal Chim Acta. 2010;682(1-2):23-36.

31. Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(10):783-93.

32. Lei P, Ayton S, Bush AI. The essential elements of Alzheimer's disease. J Biol Chem. 2021;296:100105.

33. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. Front Neurosci. 2018;12:25.

34. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):280-92.

35. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):270-9.

36. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):263-9.

37. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. Lancet Neurol. 2014;13(6):614-29. Erratum in: Lancet Neurol. 2014;13(8):757.

38. Ferrari BL, Neto GC, Nucci MP, Mamani JB, Lacerda SS, Felício AC, et al. The accuracy of hippocampal volumetry and glucose metabolism for the diagnosis of patients with suspected Alzheimer's disease, using automatic quantitative clinical tools. Medicine (Baltimore). 2019;98(45):e17824.

39. Whitwell JL, Przybelski SA, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, et al. 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. Brain. 2007;130(Pt 7):1777-86.

40. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. The Lancet Neurology. 2010;9(1):119-28.

41. Smailagic N, Lafortune L, Kelly S, Hyde C, Brayne C. 18F-FDG PET for prediction of conversion to Alzheimer’s disease dementia in people with mild cognitive impairment: an updated systematic review of test accuracy. J Alzheimers Dis. 2018;64(4):1175–94.

42. Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Tsui WH, Glodzik L, Li Y, et al. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2009;36(5):811-22.

43. Ferrando R, Damian A. Brain SPECT as a biomarker of neurodegeneration in dementia in the era of molecular imaging: still a valid option? Front Neurol. 2021;12:629442.

44. Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. Journal of Internal Medicine. 2018;284(6):643-63.

45. Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2018;14(4):535-62.

46. Zetterberg H, Bendlin BB. Biomarkers for Alzheimer's disease-preparing for a new era of disease-modifying therapies. Mol Psychiatry. 2021;26(1):296-308.

47. Janelidze S, Mattsson N, Stomrud E, Lindberg O, Palmqvist S, Zetterberg H, et al. CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease. Neurology. 2018;91(9):e867-e77.

48. Palmqvist S, Mattsson N, Hansson O. Cerebrospinal fluid analysis detects cerebral amyloid-β accumulation earlier than positron emission tomography. Brain. 2016;139(Pt 4):1226-36.

49. Chételat G, Arbizu J, Barthel H, Garibotto V, Law I, Morbelli S, et al. Amyloid-PET and 18F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. The Lancet Neurology. 2020;19(11):951-62.

50. Naveed M, Mubeen S, Khan A, Ibrahim S, Meer B. Plasma biomarkers: potent screeners of Alzheimer’s disease. Am J Alzheimers Dis Other Demen. 2019;34(5):290-301.

51. Graff-Radford J, Yong KX, Apostolova LG, Bouwman FH, Carrillo M, Dickerson BC, et al. New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers. Lancet Neurol. 2021;20(3):222-34.

52. Li TR, Yang Q, Hu X, Han Y. Biomarkers and Tools for Predicting Alzheimer's Disease in the Preclinical Stage. Curr Neuropharmacol. 2022;20(4):713-37.

53. Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, Zetterberg H, van Westen D, Jeromin A, et al. Plasma β-amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. Sci Rep. 2016;6(1):26801.

54. Schindler SE, Bollinger JG, Ovod V, Mawuenyega KG, Li Y, Gordon BA, et al. High-precision plasma β-amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. Neurology. 2019;93(17):e1647-e59.

55. Ovod V, Ramsey KN, Mawuenyega KG, Bollinger JG, Hicks T, Schneider T, et al. Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. Alzheimers Dement. 2017;13(8):841-849. Erratum in: Alzheimers Dement. 2017;13(10):1185.

56. RIZZI L. Biomarcadores liquóricos como preditores de conversão do comprometimento cognitivo leve amnéstico à demência da doença de Alzheimer [tese]. Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul; 2019. 131 f.

57. Baj J, Flieger W, Teresiński G, Buszewicz G, Sitarz R, Forma A, et al. Magnesium, calcium, potassium, sodium, phosphorus, selenium, zinc, and chromium levels in alcohol use disorder: a review. J Clin Med. 2020;9(6):1901.

58. Islam MR, Akash S, Jony MH, Alam MN, Nowrin FT, Rahman MM, et al. Exploring the potential function of trace elements in human health: a therapeutic perspective. Mol Cell Biochem. 2023;478(10):2141-71.

59. Kozlowski H, Luczkowski M, Remelli M, Valensin D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). Coord Chem Rev. 2012;256(19):2129-41.

60. Miu AC, Benga O. Aluminum and Alzheimer's disease: a new look. J Alzheimers Dis. 2006;10(2-3):179-201.

61. Corrigan FM, Reynolds GP, Ward NI. Hippocampal tin, aluminum and zinc in Alzheimer's disease. Biometals. 1993;6(3):149-54.

62. Grochowski C, Blicharska E, Krukow P, Jonak K, Maciejewski M, Szczepanek D, et al. Analysis of trace elements in human brain: its aim, methods, and concentration levels. Front Chem. 2019;7:115.

63. Abduljabbar TN, Sharp BL, Reid HJ, Barzegar-Befroeid N, Peto T, Lengyel I. Determination of Zn, Cu and Fe in human patients' serum using micro-sampling ICP-MS and sample dilution. Talanta. 2019;204:663-9.

64. Solovyev N, El-Khatib AH, Costas-Rodríguez M, Schwab K, Griffin E, Raab A, et al. Cu, Fe, and Zn isotope ratios in murine Alzheimer's disease models suggest specific signatures of amyloidogenesis and tauopathy. J Biol Chem. 2021;296:100292.

65. Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, et al. A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. J Biol Chem. 1993;268(22):16109-12.

66. Babić Leko M, Langer Horvat L, Španić Popovački E, Zubčić K, Hof PR, Šimić G. Metals in Alzheimer’s Disease. Biomedicines. 2023;11(4):1161.

67. Ahmadi S, Zhu S, Sharma R, Wilson DJ, Kraatz HB. Interaction of metal ions with tau protein. The case for a metal-mediated tau aggregation. J Inorg Biochem. 2019;194:44-51.

68. Kim MS, Kim Y, Choi H, Kim W, Park S, Lee D, et al. Transfer of a healthy microbiota reduces amyloid and tau pathology in an Alzheimer's disease animal model. Gut. 2020;69(2):283-94.

69. Miller LM, Wang Q, Telivala TP, Smith RJ, Lanzirotti A, Miklossy J. Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. J Struct Biol. 2006;155(1):30-7.

70. Dong J, Robertson JD, Markesbery WR, Lovell MA. Serum zinc in the progression of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2008;15(3):443-50.

71. Hancock SM, Portbury SD, Gunn AP, Roberts BR, Bush AI, Adlard PA. Zinc transporter-3 knockout mice demonstrate age-dependent alterations in the metalloproteome. Int J Mol Sci. 2020;21(3).

72. Huang Y, Wu Z, Cao Y, Lang M, Lu B, Zhou B. Zinc Binding Directly Regulates Tau Toxicity Independent of Tau Hyperphosphorylation. Cell Reports. 2014;8(3):831-42.

73. Cicero CE, Mostile G, Vasta R, Rapisarda V, Signorelli SS, Ferrante M, et al. Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. Environ Res. 2017;159:82-94.

74. Duroux C, Hagège A. Interactions between copper (II) and β-amyloid peptide using capillary electrophoresis-ICP-MS: Kd measurements at the nanogram scale. Anal Bioanal Chem. 2022;414(18):5347-55.

75. Maccioni RB, Farias G, Morales I, Navarrete L. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. Arch Med Res. 2010;41(3):226-31.

76. Gerhardsson L, Lundh T, Londos E, Minthon L. Cerebrospinal fluid/plasma quotients of essential and non-essential metals in patients with Alzheimer's disease. J Neural Transm (Vienna). 2011;118(6):957-62.

77. Killin LO, Starr JM, Shiue IJ, Russ TC. Environmental risk factors for dementia: a systematic review. BMC Geriatr. 2016;16(1):175.

78. Adlard PA, Bush AI. Metals and Alzheimer's Disease: How Far Have We Come in the Clinic? J Alzheimers Dis. 2018;62(3):1369-79.

79. Vaz FN, Fermino BL, Haskel MVL, Wouk J, de Freitas GBL, Fabbri R, et al. T The relationship between copper, iron, and selenium levels and Alzheimer disease. Biol Trace Elem Res. 2018;181(2):185-91.

80. Squitti R, Ventriglia M, Simonelli I, Bonvicini C, Costa A, Perini G, et al. Copper imbalance in Alzheimer's disease: meta-analysis of serum, plasma, and brain specimens, and replication study evaluating ATP7B gene variants. Biomolecules. 2021;11(7):960.

81. Jacobs RW, Duong T, Jones RE, Trapp GA, Scheibel AB. A reexamination of aluminum in Alzheimer's disease: analysis by energy dispersive X-ray microprobe and flameless atomic absorption spectrophotometry. Can J Neurol Sci. 1989;16(4 Suppl):498–503.

82. Orvini E, Speziali M. Applicability and Limits of Instrumental Neutron Activation Analysis: State of the Art in the Year 2000. Microchemical Journal. 1998;59(1):160-72.

83. Lovell MA, Ehmann WD, Markesbery WR. Laser microprobe analysis of brain aluminum in Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1993;33(1):36-42.

84. Al-Hakkani MF. Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry "ICP–MS": fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters. SN Applied Sciences. 2019;1(7):791.

85. Wilschefski SC, Baxter MR. Inductively coupled plasma mass spectrometry: introduction to analytical aspects. Clin Biochem Rev. 2019;40(3):115-33.

86. Doroszkiewicz J, Farhan JA, Mroczko J, Winkel I, Perkowski M, Mroczko B. Common and trace metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Int J Mol Sci. 2023;24(21).

87. Wang L, Yin YL, Liu XZ, Shen P, Zheng YG, Lan XR, et al. Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Transl Neurodegener. 2020;9(1):10.

88. Benoit SL, Maier RJ. The nickel-chelator dimethylglyoxime inhibits human amyloid beta peptide in vitro aggregation. Sci Rep. 2021;11(1):6622.

89. Metsla K, Kirss S, Laks K, Sildnik G, Palgi M, Palumaa T, et al. α-lipoic acid has the potential to normalize copper metabolism, which is dysregulated in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2022;85(2):715-28.

90. Moor C, Devos W, Guecheva M, Kobler J. Inductively coupled plasma mass spectrometry: a versatile tool for a variety of different tasks. Fresenius J Anal Chem. 2000;366(2):159-64.

91. Yang HS, LaFrance DR, Hao Y. Elemental testing using inductively coupled plasma mass spectrometry in clinical laboratories. Am J Clin Pathol. 2021;156(2):167-75.

92. Pinheiro FC, Nóbrega JA. An overview of sample preparation procedures for determination of elemental impurities in medicines. Microchemical J. 2022;175:107189.

93. Engelhard C. Inductively coupled plasma mass spectrometry: recent trends and developments. Anal Bioanal Chem. 2011;399(1):213-9.

94. Tanner SD, Baranov VI, Bandura DR. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 2002;57(9):1361-452.

95. Bulska E, Wagner B. Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2016;374(2079):20150369.

96. Nogueira A, editor. ICP-MS espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado. São Paulo: Quipá; 2023.

97. Oliveira TC. Estabelecimento de metodologia para determinação de 93Zr em rejeitos radioativos por espectrometria de cintilação líquida (LSC) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2014. 113 f.

98. Aguiar GF. Avaliação de métodos empregando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) para determinação de impurezas elementares e especiação química de arsênio e mercúrio em fármacos e excipientes [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2017.

99. Batista BL, Rodrigues JL, Nunes JA, de Oliveira Souza VC, Barbosa F. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. Analytica Chimica Acta. 2009;639(1):13-8.

100. Lemos BB. Avaliação do uso da cela de reação dinamica em espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos quimicos em sangue. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2009.

101. Chen ZY, Zhang Y. Animal models of Alzheimer's disease: applications, evaluation, and perspectives. Zool Res. 2022;43(6):1026-40.

102. Sterniczuk R, Dyck RH, Laferla FM, Antle MC. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes. Brain Res. 2010;1348:139-48.

103. Pádua MS, Guil-Guerrero JL, Prates JAM, Lopes PA. Insights on the Use of Transgenic Mice Models in Alzheimer's Disease Research. Int J Mol Sci. 2024;25(5).

104. Sterniczuk R, Antle MC, LaFerla FM, Dyck RH. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. Brain Research. 2010;1348:149-55.

105. Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E. Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). Behav Brain Res. 2012;234(2):334-42.

106. Stover KR, Campbell MA, Van Winssen CM, Brown RE. Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. Behav Brain Res. 2015;289:29-38.

107. Saré RM, Lemons A, Smith CB. Behavior testing in rodents: highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility. Brain Sci. 2021;11(4):522.

108. Shi X, Bai H, Wang J, Wang J, Huang L, He M, et al. Behavioral assessment of sensory, motor, emotion, and cognition in rodent models of intracerebral hemorrhage. Front Neurol. 2021;12:667511.

109. Hall AM, Roberson ED. Mouse models of Alzheimer's disease. Brain Res Bull. 2012;88(1):3-12.

110. Forner S, Kawauchi S, Balderrama-Gutierrez G, Kramár EA, Matheos DP, Phan J, et al. Systematic phenotyping and characterization of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. Sci Data. 2021;8(1):270.

111. Li X, Chen J, Feng W, Wang C, Chen M, Li Y, et al. Berberine ameliorates iron levels and ferroptosis in the brain of 3 × Tg-AD mice. Phytomedicine. 2023;118:154962.

112. Ulaganathan S, Pitchaimani A. Spontaneous and familial models of Alzheimer's disease: Challenges and advances in preclinical research. Life Sciences. 2023;328:121918.

113. Yörük MA, Okkay U, Savaş A, Bayram C, Sezen S, Ertuğrul M, et al. Behavioral tests used in experimental animal models. 2022;3:14-22.

114. Yokoyama M, Kobayashi H, Tatsumi L, Tomita T. Mouse Models of Alzheimer's Disease. Front Mol Neurosci. 2022;15:912995.

115. Bareiss SK, Johnston T, Lu Q, Tran TD. The effect of exercise on early sensorimotor performance alterations in the 3xTg-AD model of Alzheimer’s disease. Neuroscience Research. 2022;178:60-8.

116. Belfiore R, Rodin A, Ferreira E, Velazquez R, Branca C, Caccamo A, et al. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. Aging Cell. 2019;18(1):e12873.

117. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron. 2003;39(3):409-21.

118. Research models. Boston: AlzForum Foundation Inc.; 2025. Phenotype characterization [cited 2024 Jun 17]. Available from: https://www.alzforum.org/research-models/3xtg.

119. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. Nat Protoc. 2006;1(2):848-58.

120. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Brain Res Rev. 2001;36(1):60-90.

121. Lueptow LM. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. J Vis Exp. 2017(126):55718.

122. Huang L, Xiao D, Sun H, Qu Y, Su X. Behavioral tests for evaluating the characteristics of brain diseases in rodent models: Optimal choices for improved outcomes (Review). Mol Med Rep. 2022;25(5):183.

123. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn Process. 2012;13(2):93-110.

124. Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. ILAR J. 2014;55(2):310-32.

125. Gillani N, Arslan T. Intelligent sensing technologies for the diagnosis, monitoring and therapy of Alzheimer’s disease: a systematic review. Sensors (Basel). 2021;21(12):4249.

126. Bagg J, Obie J, Shang F, Lista N, Kiessling C. Behavioral sex difference in healthy sprauge-dawley rats. Binghamton Univ Undergraduate J. 2017;3(1):1–23.

127. Nelson RJ, Bumgarner JR, Liu JA, Love JA, Meléndez-Fernández OH, Becker-Krail DD, et al. Time of day as a critical variable in biology. BMC Biol. 2022;20(1):142.

128. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. J Vis Exp. 2011(53):2920.

129. Fassler M, Rappaport MS, Cuño CB, George J. Engagement of TREM2 by a novel monoclonal antibody induces activation of microglia and improves cognitive function in Alzheimer's disease models. J Neuroinflammation. 2021;18(1):19.

130. Gao X, Pan H, Han Y, Feng L, Xiong J, Luo S, et al. Quantitative imaging of amyloid beta peptide (Aβ) in Alzheimer's brain tissue by laser ablation ICP-MS using gold nanoparticles as labels. Analytica Chimica Acta. 2021;1148:238197.

131. McCall NM, Sprow GM, Delpire E, Thiele TE, Kash TL, Pleil KE. Effects of sex and deletion of neuropeptide Y2 receptors from GABAergic neurons on affective and alcohol drinking behaviors in mice. Front Integr Neurosci. 2013;7:100.

132. Petrov K, Pechlivanova D, Tchekalarova J, Nenchovska Z, Mitreva R, Stoynev A. Gender differences in diabetes mellitus-induced behavioural changes in wistar and spontaneously hypertensive rats. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences. 2015;68:747-54.

133. Klarer M, Arnold M, Günther L, Winter C, Langhans W, Meyer U. Gut vagal afferents differentially modulate innate anxiety and learned fear. J Neurosci. 2014;34(21):7067-76.

134. Kokras N, Dioli C, Paravatou R, Sotiropoulos MG, Delis F, Antoniou K, et al. Psychoactive properties of BNN27, a novel neurosteroid derivate, in male and female rats. Psychopharmacology (Berl). 2020;237(8):2435-49.

135. McElroy DL, Howland JG. Sex differences in exploratory behavior of rats successfully performing the object-in-place recognition memory test. Behav Brain Res. 2025;477:115303.

136. Raymond JS, Rehn S, James MH, Everett NA, Bowen MT. Sex differences in the social motivation of rats: Insights from social operant conditioning, behavioural economics, and video tracking. Biol Sex Differ. 2024;15(1):57.

137. Lovick TA, Zangrossi H, Jr. Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. Front Psychiatry. 2021;12:711065.

138. Marczinski C, Perrot-Sinal TS, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Sex differences in spontaneous locomotor activity and rotational behavior in meadow voles. Physiol Behav. 1998;65(2):387-91.

139. Armijo E, Edwards G, Flores A, Vera J, Shahnawaz M, Moda F, et al. Induced pluripotent stem cell-derived neural precursors improve memory, synaptic and pathological abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. Cells. 2021;10(7):1802.

140. Heijkoop R, Huijgens PT, Snoeren EMS. Assessment of sexual behavior in rats: the potentials and pitfalls. Behav Brain Res. 2018;352:70-80.

141. Bernstein BJ, Kendricks DR, Fry S, Wilson L, Koopmans B, Loos M, et al. Sex differences in spontaneous behavior and cognition in mice using an automated behavior monitoring system. Physiol Behav. 2024;283:114595.

142. Takahashi Y, Sawa K, Okada T. The diurnal variation of performance of the novel location recognition task in male rats. Behavioural Brain Research. 2013;256:488-93.

143. Bekci E, Gokmen RC, Kanit L, Gozen O, Balkan B, Koylu EO, et al. Enhanced Novel Object Recognition and Spatial Memory in Rats Selectively Bred for High Nicotine Preference. Brain Sci. 2024;14(5):427.

144. Becegato M, Silva RH. Object recognition tasks in rats: Does sex matter? Front Behav Neurosci. 2022;16:970452.

145. Zorzo C, Arias JL, Méndez M. Are there sex differences in spatial reference memory in the Morris water maze? A large-sample experimental study. Learn Behav. 2024;52(2):179-90.

146. Valentinuzzi VS, Menna-Barreto L, Xavier GF. Effect of circadian phase on performance of rats in the Morris water maze task. J Biol Rhythms. 2004;19(4):312-24.

147. Wang B, Han S. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates deficits in synaptic plasticity and brain functions following traumatic brain injury. Cerebellum. 2018;17(4):477-84.

148. Mifflin MA, Winslow W, Surendra L, Tallino S, Vural A, Velazquez R. Sex differences in the IntelliCage and the Morris water maze in the APP/PS1 mouse model of amyloidosis. Neurobiol Aging. 2021;101:130-40.

149. Nelson RJ, Bumgarner JR, Walker WH, 2nd, DeVries AC. Time-of-day as a critical biological variable. Neurosci Biobehav Rev. 2021;127:740-6.

150. Guzmán-Ramos K, Moreno-Castilla P, Castro-Cruz M, McGaugh JL, Martínez-Coria H, LaFerla FM, et al. Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. Learning and Memory. 2012;19(10):453-60.

151. Barros-Viegas AT, Carmona V, Ferreiro E, Guedes J, Cardoso AM, Cunha P, et al. miRNA-31 Improves Cognition and Abolishes Amyloid-β Pathology by Targeting APP and BACE1 in an Animal Model of Alzheimer's Disease. Molecular Therapy Nucleic Acids. 2020;19:1219-36.

152. Lalonde R, Strazielle C. Neurobehavioral characteristics of mice with modified intermediate filament genes. Rev Neurosci. 2003;14(4):369-85.

153. Baglietto-Vargas D, Chen Y, Suh D, Ager RR, Rodriguez-Ortiz CJ, Medeiros R, et al. Short-term modern life-like stress exacerbates Aβ-pathology and synapse loss in 3xTg-AD mice. J Neurochem. 2015;134(5):915-26.

154. Herline K, Prelli F, Mehta P, MacMurray C, Goñi F, Wisniewski T. Immunotherapy to improve cognition and reduce pathological species in an Alzheimer's disease mouse model. Alzheimer's research & therapy. 2018;10(1):54.

155. Ha J, Kwon GE, Son Y, Jang SA, Cho SY, Park SJ, et al. Cholesterol profiling reveals 7β-hydroxycholesterol as a pathologically relevant peripheral biomarker of Alzheimer's disease. Psychiatry Clin Neurosci. 2024;78(8):473-81.

156. Dionisio-Santos DA, Karaahmet B, Belcher EK, Owlett LD, Trojanczyk LA, Olschowka JA, et al. Evaluating effects of glatiramer acetate treatment on amyloid deposition and tau phosphorylation in the 3xTg mouse model of Alzheimer’s disease. Front Neurosci. 2021;15:758677.

157. Mulder CK, Gerkema MP, Van Der Zee EA. Circadian clocks and memory: time-place learning. Front Mol Neurosci. 2013;6:8.

158. Babić Leko M, Langer Horvat L, Španić Popovački E, Zubčić K, Hof PR, Šimić G. Metals in Alzheimer's disease. Biomedicines. 2023;11(4):1161.

159. Socha K, Klimiuk K, Naliwajko SK, Soroczyńska J, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, et al. Dietary habits, selenium, copper, zinc and total antioxidant status in serum in relation to cognitive functions of patients with Alzheimer's disease. Nutrients. 2021;13(2):287.

160. Wang ZX, Tan L, Wang HF, Ma J, Liu J, Tan MS, et al. Serum iron, zinc, and copper levels in patients with Alzheimer's disease: a replication study and meta-analyses. J Alzheimers Dis. 2015;47(3):565-81.

161. Bucossi S, Ventriglia M, Panetta V, Salustri C, Pasqualetti P, Mariani S, et al. Copper in Alzheimer's disease: a meta-analysis of serum,plasma, and cerebrospinal fluid studies. J Alzheimers Dis. 2011;24(1):175-85. Corrected and republished in: J Alzheimers Dis. 2012;30(4):981-4.

162. Pu Z, Xu W, Lin Y, He J, Huang M. Oxidative Stress Markers and Metal Ions are Correlated With Cognitive Function in Alzheimer's Disease. Am J Alzheimers Dis Other Demen. 2017;32(6):353-9.

163. Squitti R, Ghidoni R, Simonelli I, Ivanova ID, Colabufo NA, Zuin M, et al. Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators. J Trace Elem Med Biol. 2018;45:181-8.

164. Yadav J, Verma AK, Ahmad MK, Garg RK, Shiuli, Mahdi AA, et al. Metals toxicity and its correlation with the gene expression in Alzheimer's disease. Mol Biol Rep. 2021;48(4):3245-52.

165. Kazemi T, Moodi M, Rajabi S, Sharifi F, Samarghandian S, Khorashadizadeh M, Farkhondeh T. Trace element concentration and cognitive dysfunction in elderly residents in birjand. Curr Alzheimer Res. 2022;19(9):674-680.

166. Li K, Li A, Mei Y, Zhao J, Zhou Q, Li Y, et al. Trace elements and Alzheimer dementia in population-based studies: a bibliometric and meta-analysis. Environ Pollut. 2023;318:120782.

167. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. Metallomics. 2014;6(2):292-300.

168. Olde Rikkert MG, Verhey FR, Sijben JW, Bouwman FH, Dautzenberg PL, Lansink M, et al. Differences in nutritional status between very mild Alzheimer's disease patients and healthy controls. J Alzheimers Dis. 2014;41(1):261-71.

169. Paglia G, Miedico O, Cristofano A, Vitale M, Angiolillo A, Chiaravalle AE, et al. Distinctive pattern of serum elements during the progression of Alzheimer's disease. Sci Rep. 2016;6(1):22769.

170. Chmatalova Z, Vyhnalek M, Laczo J, Hort J, Pospisilova R, Pechova M, et al. Relation of plasma selenium and lipid peroxidation end products in patients with Alzheimer's disease. Physiol Res. 2017;66(6):1049-56.

171. Strumylaite L, Kregzdyte R, Kucikiene O, Baranauskiene D, Simakauskiene V, Naginiene R, et al. Alzheimer's disease association with metals and metalloids concentration in blood and urine. Int J Environ Res Public Health. 2022;19(12):7309.

172. Baum L, Chan IHS, Cheung SK-K, Goggins WB, Mok V, Lam L, et al. Serum zinc is decreased in Alzheimer's disease and serum arsenic correlates positively with cognitive ability. BioMetals. 2010;23(1):173-9.

173. Mastrangelo MA, Bowers WJ. Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. BMC Neuroscience. 2008;9(1):81.

174. Wirths O, Dins A, Bayer TA. AβPP accumulation and/or intraneuronal amyloid-β accumulation? The 3xTg-AD mouse model revisited. J Alzheimers Dis. 2012;28(4):897-904.

175. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging. 2003;24(8):1063-70.

176. Rosenberg RN, Fu M, Lambracht-Washington D. Active full-length DNA Aβ42 immunization in 3xTg-AD mice reduces not only amyloid deposition but also tau pathology. Alzheimers Res Ther. 2018;10(1):115.

177. Ashe KH, Zahs KR. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. Neuron. 2010;66(5):631-45.

178. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. Cell. 2016;164(4):603-15.

179. Jucker M, Walker LC. Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. Nature Neuroscience. 2018;21(10):1341-9.

180. Son HJ, Jeong YJ, Yoon HJ, Lee SY, Choi G-E, Park J-A, et al. Assessment of brain beta-amyloid deposition in transgenic mouse models of Alzheimer's disease with PET imaging agents ^{18}F-flutemetamol and ^{18}F-florbetaben. BMC Neurosci. 2018;19(1):45.

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative condition and the leading cause of dementia in the elderly, affecting over 55 million people worldwide, with an estimated increase to 139 million by 2050. It is characterized by the formation of beta-amyloid plaques and neurofibrillary tangles, leading to synaptic dysfunction and brain atrophy. Identifying reliable biomarkers is crucial for early diagnosis, disease progression monitoring, and the development of more effective treatments, especially given its increasing prevalence. **Purpose:** To evaluate Alzheimer's disease biomarkers through the quantification of serum trace elements in the 3xTg-AD animal model. **Methods:** Initially, the influence of the time of day (morning and afternoon) and animal sex on behavioral parameters in healthy animals was assessed to determine the best experimental condition. After this stage, behavioral evaluation was conducted monthly for 12 months in 3xTg-AD transgenic animals using the Morris water maze (spatial memory), novel object recognition test (episodic memory), and open field test (locomotor activity). In parallel, copper, zinc, and selenium levels were measured in serum samples using ICP-MS. For β-amyloid peptide detection by immunohistochemistry, brain tissue samples were collected and analyzed for the presence of beta-amyloid plaques. **Results:** Behavioral tests revealed progressive deficits in spatial and episodic memory in transgenic animals, with significant alterations observed in the Morris water maze and novel object recognition test. Locomotor activity showed a variable pattern over time, with higher initial activity followed by a decline in later stages. The analysis of trace elements revealed distinct variation patterns. Copper showed a progressive increase, with greater significance in the initial and final months. Zinc and selenium exhibited a linear decrease, with selenium showing a more pronounced decline from the early months. Immunohistochemical analysis demonstrated that beta-amyloid deposition, both intracellular and in plaques, progressively increased in transgenic animals, becoming pronounced from the 5th month and peaking between the 8th and 12th months. **Conclusions:** Trace elements proved to be promising biomarkers for Alzheimer's disease, with changes in copper, zinc, and selenium levels observed from the third month of life. These changes correlated with behavioral deficits and β-amyloid accumulation, reflecting disease progression. This study reinforces the importance of these biomarkers in Alzheimer's diagnosis and monitoring.

Keywords: Alzheimer disease; Inductively coupled plasma mass spectrometry ICP-MS; Biomarkers; Trace elements; Behavior, animal