



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Ariadne Elisa Belo da Silva

**Avaliação do efeito neuroprotetor do antagonismo do receptor P2X7 em
camundongos submetidos ao modelo animal da doença de Alzheimer induzido
por estreptozotocina**

Florianópolis
2026

Ariadne Elisa Belo da Silva

**Avaliação do efeito neuroprotetor antagonismo do receptor P2X7 em
camundongos submetidos ao modelo animal da doença de Alzheimer induzido
por estreptozotocina**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof^o. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Coorientadora: Prof^a. Dra. Geanne Matos Andrade

Florianópolis

2026

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Belo-Silva, Ariádne Elisa

Avaliação do efeito neuroprotetor do antagonismo do receptor P2X7 em camundongos submetidos ao modelo animal da doença de Alzheimer induzido por estreptozotocina / Ariádne Elisa Belo-Silva ; orientador, Rui Daniel Schröder Prediger, coorientadora, Geanne Matos de Andrade, 2026. 130 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Neuropsicofarmacologia. 3. Doença de Alzheimer Esporádica. 4. Receptor Purinérgico P2X7. 5. Antagonista Brilliant Blue G. I. Prediger, Rui Daniel Schröder . II. Andrade, Geanne Matos de . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Ariadne Elisa Belo da Silva

Avaliação do efeito neuroprotetor do antagonismo do receptor P2X7 em camundongos submetidos ao modelo animal da doença de Alzheimer induzido por estreptozotocina

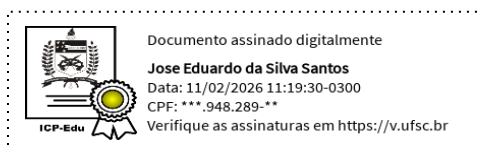
O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 15 de Dezembro de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Luisa Mota da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

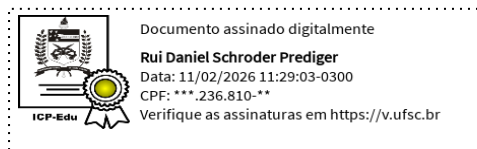
Prof.(a) Dr.(a) Manuella Pinto Kaster
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.(a) Dr.(a) Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Universidade Federal do Pará - UFPA

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Orientador

Florianópolis, 2026

Dedico este trabalho a todas as meninas e mulheres que vieram antes de mim e que, com coragem, resistência e esperança, pavimentaram os caminhos por onde, hoje, eu posso passar.

E também àquelas que ainda virão, a quem desejo que possam caminhar mais livres, mais fortes e mais donas de seus próprios passos.

Que sejamos o início, a travessia e a revolução.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Andréa, e aos meus irmãos, Adriele e Ricardo, minha base e meu porto seguro. Tudo o que sou e tudo o que conquistei carrega em si a marca do amor indescritível que nos une.

À minha família - tia Alzira, tia Diana, tio Luís, Maria do Carmo, Stephanie, Karol, Rafael e ao meu querido e eterno Vô Benedito (*in memoriam*) - por cada palavra de apoio, cada abraço silencioso, cada vibração compartilhada. Minha família celebrou minhas vitórias como verdadeiros títulos de Copa do Mundo e me acolheu com ternura nas minhas quedas. Este sonho é nosso.

À Giovanna, meu amor mais puro, que chegou no tempo certo e injetou ânimo nos meus dias e trouxe a paz de que eu precisava. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada gesto de carinho e por acreditar em mim até quando eu mesma duvidei. Carrego você comigo em cada linha desta conquista.

Ao Professor Dr. Rui Daniel Prediger, meu orientador e, mais do que isso, meu "Pai Científico" - referência de sabedoria e generosidade. Sua orientação ultrapassou as fronteiras da ciência e moldou profundamente quem me tornei como pesquisadora e como pessoa. Serei eternamente grata por ter caminhado ao seu lado.

À Professora Geanne Matos de Andrade, minha coorientadora, e à toda equipe do Laboratório de Neurociência Comportamental da Universidade Federal do Ceará pelo acolhimento e pela colaboração inestimável ao longo desta jornada.

Ao Professor Rodrigo Cunha, meu orientador na Universidade de Coimbra, por todos os inestimáveis ensinamentos e por tornar possível a realização do meu estágio de doutorado sanduíche em Portugal – experiência extraordinária que levarei para a vida inteira.

À Dra. Samira Ferreira, uma das pesquisadoras mais brilhantes com quem já tive a oportunidade de trabalhar (e de aprender). Além de cientista ímpar, um ser humano excepcional – sou imensamente grata por todos os momentos em que estivemos lado a lado. Sempre citarei a Dra. Samira como uma das minhas maiores e mais importantes fontes de inspiração. Obrigada por tanto.

À equipe do Laboratório de Neuromodulação da Universidade de Coimbra: Cátia, Liliana, Dr. Ângelo, Dra. Paula Agostinho e Dr. João Pedro pelo acolhimento,

pela colaboração e pela amizade que me fizeram sentir em casa mesmo estando tão longe.

Aos meus queridos *roommates* em Coimbra: Valentina, Leonardo, Maria Fernanda e Manuela, que se tornaram casa, família e riso. Vocês tornaram os dias mais leves e sempre lembrarei com muito carinho dos meses de companheirismo que vivemos.

A todos que cruzaram meu caminho e que, de alguma forma, deixaram sua marca na minha formação acadêmica, profissional e humana. Minha eterna gratidão.

Obrigada, de coração.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – (CAPES).

Somos feitos de memória — esse museu onírico de formas que dançam e desvanecem. Ali repousam os amores, os temores, o nome da infância e a hora exata em que fomos felizes. Quando ela se parte, despedaçam-se os espelhos onde antes nos reconhecíamos inteiros. Assim, quando a memória falha, não é apenas o passado que se apaga, mas o próprio sujeito que se dilui no não-ser.

Jorge Luis Borges (Parafraseado)

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) constitui um dos principais desafios da medicina e da neurociência, caracterizando-se por declínio cognitivo progressivo associado à neuroinflamação crônica, disfunção sináptica e alterações metabólicas cerebrais. Evidências crescentes indicam que disfunções gliais desempenham papel relevante nas fases iniciais da neurodegeneração. Nesse contexto, o presente estudo investigou os efeitos do antagonismo do receptor purinérgico P2X7 (P2X7R) por meio da administração do corante *Brilliant Blue G* (BBG) em camundongos submetidos ao modelo experimental de DA induzido pela injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) (3mg/kg), que reproduz características centrais da DA esporádica, como resistência insulínica cerebral, disfunção mitocondrial, neuroinflamação exacerbada e prejuízos cognitivos. Os animais tratados com STZ e/ou BBG (50mg/kg) foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais e emocionais, bem como a análises bioquímicas, imunohistoquímicas e eletrofisiológicas. Os resultados demonstraram que a administração de STZ induziu déficits cognitivos e emocionais, acompanhados por aumento de marcadores de estresse oxidativo e ativação glial no hipocampo. Em contraste, o tratamento com BBG esteve associado à atenuação desses prejuízos, evidenciada por desempenho semelhante ao grupo controle em múltiplas tarefas comportamentais, redução dos níveis de TBARS e nitrito, preservação da potenciação de longa duração (LTP) e diminuição da expressão hipocampal de GFAP e Iba-1. Tais efeitos ocorreram sem alterações significativas nos níveis glicêmicos, sugerindo uma ação central independente de modificações metabólicas periféricas. Em conjunto, os resultados indicam que o antagonismo do P2X7R modula de forma integrada processos neuroinflamatórios, oxidativos e sinápticos associados ao modelo ICV-STZ, reforçando o papel desse receptor como um alvo funcional relevante na interface entre metabolismo cerebral, inflamação glial e plasticidade sináptica. Dessa forma, o presente estudo contribui para a validação do modelo ICV-STZ como uma ferramenta experimental útil na triagem farmacológica de estratégias terapêuticas voltadas à modulação do P2X7R em estágios iniciais da neurodegeneração associada à DA.

Palavras-chave: Brilliant Blue G; P2X7, Neuroinflamação; Sistema Purinérgico, Doença de Alzheimer Esporádica.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) represents one of the major challenges in contemporary medicine and neuroscience, being characterized by progressive cognitive decline associated with chronic neuroinflammation, synaptic dysfunction, and cerebral metabolic alterations. Increasing evidence indicates that glial dysfunction plays a critical role in the early stages of neurodegeneration. In this context, the present study investigated the effects of antagonizing the purinergic P2X7 receptor (P2X7R) through the administration of Brilliant Blue G (BBG) in mice subjected to an experimental model of AD induced by intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ; 3 mg/kg). This model reproduces key features of sporadic AD, including cerebral insulin resistance, mitochondrial dysfunction, exacerbated neuroinflammation, and cognitive impairments. Animals treated with STZ and/or BBG (50 mg/kg) were subjected to a comprehensive battery of behavioral and emotional assessments, as well as biochemical, immunohistochemical, and electrophysiological analyses. STZ administration induced robust cognitive and emotional deficits, accompanied by increased markers of oxidative stress and glial activation in the hippocampus. In contrast, BBG treatment was associated with a consistent attenuation of these impairments, as evidenced by performance comparable to control animals across multiple behavioral tasks, reduced levels of TBARS and nitrite, preservation of long-term potentiation (LTP), and decreased hippocampal expression of GFAP and Iba-1. Importantly, these effects occurred in the absence of significant changes in glycemic levels, suggesting a predominantly central mechanism independent of peripheral metabolic alterations. Taken together, these findings indicate that P2X7R antagonism modulates neuroinflammatory, oxidative, and synaptic processes associated with the ICV-STZ model, reinforcing the role of this receptor as a relevant functional target at the interface between cerebral metabolism, glial inflammation, and synaptic plasticity. Thus, the present study supports the use of the ICV-STZ model as a valuable experimental tool for pharmacological screening of therapeutic strategies aimed at P2X7R modulation during the early stages of AD-associated neurodegeneration.

Keywords: Brilliant Blue G; P2X7 receptor; Neuroinflammation; Purinergic system; Sporadic Alzheimer's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Projeção do número de casos de demência no Brasil entre 2013 e 2050.	16
Figura 2 – Projeção do custo global com demência entre 2019 e 2050, discriminado por nível de renda dos países	17
Figura 3 – Hipótese da Cascata Amiloide na Doença de Alzheimer.	20
Figura 4 – Mecanismos integrativos do envolvimento do receptor P2X7 sobre a fisiopatologia da DA	30
Figura 5 – Delineamento Experimental	35
Figura 6 – Distância total percorrida e número de rearings registrados no Teste do Campo Aberto	47
Figura 7 – Efeito do tratamento com BBG sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado	49
Figura 8 – Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	51
Figura 9 – Índice de discriminação no teste de reconhecimento de objeto novo	51
Figura 10 – Porcentagem de alternância espontânea no Labirinto em Y	52
Figura 11 – Latência de descida no Teste de Esquiva Passiva	53
Figura 12 – Níveis de glicose sanguínea	56
Figura 13 – Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	58
Figura 14 – Concentração de nitrito	59
Figura 15 – Quantificação da densidade de microglias na região CA1 do Hipocampo	62
Figura 16 – Análise morfológica da microglia na região CA1 do hipocampo	65
Figura 17 – Quantificação da densidade de astrócitos na região CA1 do hipocampo	67
Figura 18 – Análise morfológica de astrócitos na região CA1 do hipocampo	70
Figura 19 – Avaliação eletrofisiológica da plasticidade e excitabilidade sináptica em fatias hipocampais <i>ex vivo</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vias de Administração, Dose, Aspectos Farmacodinâmicos e Farmacocinéticos e Efeitos Adversos dos Fármacos Aprovados para o Tratamento da Doença de Alzheimer.....	22
Tabela 2 – Evidências Recentes Acerca dos Efeitos Neuroprotetores do Sistema Purinérgico na Doença de Alzheimer Obtidas A Partir de Estudos Clínicos, Pré-Clínicos e <i>In Vitro</i>	28
Tabela 3 – Sumário dos Efeitos Comportamentais de STZ vs. BBG sobre os diferentes testes comportamentais.....	54
Tabela 4 – Sumário dos Efeitos Bioquímicos da STZ e do BBG sobre Marcadores de Estresse Oxidativo, Nitrosativo e Metabólico.....	60
Tabela 5 – Sumário dos Efeitos da STZ e do BBG sobre a Ativação e Morfologia Glial na Região CA1 do Hipocampo	71
Tabela 6 – Sumário dos Efeitos Bioquímicos da STZ Sobre Parâmetros Eletrofisiológicos da Transmissão Sináptica Hipocampal.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF - *Artificial Cerebrospinal Fluid* (Fluido cérebro-espinhal artificial)
ANOVA - Análise de Variância
Akt – Proteína Quinase B
BBG - *Brilliant Blue G*
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCL - Comprometimento Cognitivo Leve
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CPF - Córtex Pré-Frontal
DA - Doença de Alzheimer
DAB - 3,3'-Diaminobenzidina
DAe – Doença de Alzheimer Esporádica
Daf – Doença de Alzheimer Familiar
EPM - Erro Padrão da Média
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
GFAP - *Glial Fibrillary Acidic Protein* (Proteína Ácida Fibrilar Glial)
HFS - *High-Frequency Stimulation* (Estimulação de Alta Frequência)
Iba-1 – Molécula de Adaptação de Ligação Ionizada de Cálcio 1
ICV - Intracerebroventricular
IL-1 β - Interleucina 1 beta
LCE - Labirinto em Cruz Elevado
LTP - *Long-Term Potentiation* (Potenciação de Longa Duração)
MDA - Malondialdeído
MEC - Ministério da Educação
NMDA - *N-Methyl-D-Aspartate*
NPDM - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
P2X7R - Receptor Purinérgico P2X7
PBR – Países de Baixa Renda
PBMR – Países de Baixa e Média Renda
PRMA – Países de Média-Alta Renda
PAR – Países de Alta Renda.
PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Solução Salina Tampão de Fosfato)
PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PSD 95 – Proteína de Densidade Pós-Sináptica 95

RO - Reconhecimento de Objeto

SNC - Sistema Nervoso Central

STZ - Estreptozotocina

TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

TLR4 - *Toll-like Receptor 4* (Receptor tipo Toll 4)

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor* alpha (Fator de Necrose Tumoral alfa)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS	49
5.1	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS.....	49
5.1.1	<i>Teste do campo aberto</i>	<i>49</i>
5.1.2	<i>Teste do nado forçado</i>	<i>50</i>
5.1.3	<i>Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)</i>	<i>51</i>
5.1.4	<i>Teste do reconhecimento de objeto novo.....</i>	<i>53</i>
5.1.5	<i>Teste do labirinto em Y.....</i>	<i>54</i>
5.1.6	<i>Teste de esquiva passiva.....</i>	<i>55</i>
5.2	RESULTADOS BIOQUÍMICOS	58
5.2.1	<i>Glicose sanguínea</i>	<i>58</i>
5.2.2	<i>Peroxidação Lipídica.....</i>	<i>59</i>
5.2.3	<i>Quantificação de nitrito/nitrato.....</i>	<i>61</i>
5.3	RESULTADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	63
5.3.1	<i>Densidade de microglial na região CA1 do hipocampo</i>	<i>63</i>
5.3.2	<i>Reconstituição 3D de micróglia</i>	<i>65</i>
5.3.3	<i>Densidade de astrocitária na região CA1 do hipocampo.....</i>	<i>69</i>
5.3.4	<i>Reconstituição 3D de astrócitos</i>	<i>70</i>
5.4	RESULTADOS DA ELETROFISIOLOGIA.....	75
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS.....	109
	ANEXO A – CEUA/UFC.....	130

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência no mundo (Kolay *et al.* 2025), comprometendo progressivamente funções cognitivas superiores, tais como memória, linguagem, orientação espacial, tomada de decisão e autonomia funcional, culminando em um estado de dependência total e deterioração generalizada do indivíduo (Christimann *et al.* 2025).

Atualmente, estima-se que mais de 55 milhões de pessoas convivam com a demência em nível global, sendo a DA responsável por cerca de 60 a 80% desses casos (Li *et al.* 2022). O envelhecimento é um fator-chave para o aparecimento e progressão da doença. Entre indivíduos na faixa etária dos 65 aos 74 anos de idade, estima-se que a incidência da DA seja de cerca de 3%, subindo para os 19% nos indivíduos entre os 75 e 84 anos, enquanto em idosos acima dos 84 anos a incidência chega a atingir até 47% (Alzheimer's Association, 2017).

As projeções são ainda mais alarmantes: segundo estimativas populacionais baseadas nos dados publicados no último boletim da organização mundial de saúde (OMS, 2021) e nas análises de Nichols *et al.* (2022), o número de indivíduos acometidos por algum tipo de demência pode quase triplicar nas próximas décadas, passando de cerca de 57,4 milhões em 2019 para aproximadamente 152,8 milhões de pessoas até 2050, em grande parte impulsionado pelo envelhecimento populacional e pelo crescimento demográfico global. Ainda, mais especificamente no Brasil, o impacto segue a mesma curva ascendente, com aproximadamente 1,5 milhão de casos já diagnosticados e estimativas conservadoras apontando para uma triplicação dessa prevalência nas próximas décadas (Figura 1) (Feter e Leite, 2021; Bertola *et al.* 2023).

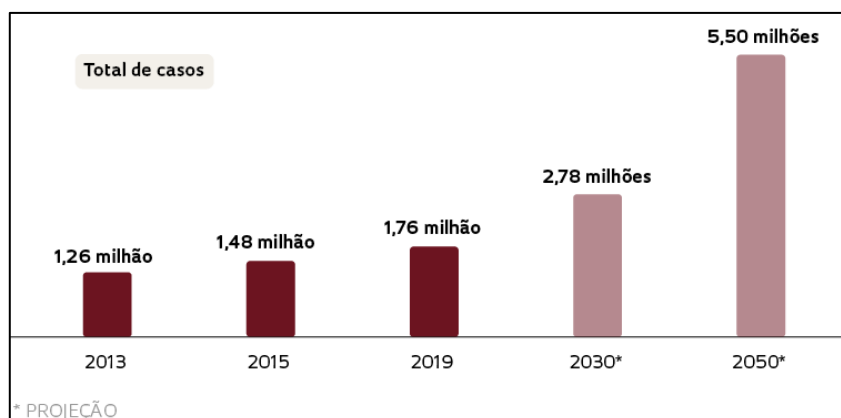


Figura 1. Projeção do número de casos de demência no Brasil entre 2013 e 2050.
 Fonte: Adaptado de Bertola *et al.* (2023), *Journal of Gerontology*.

Contudo, os números, por si só, não refletem a totalidade do impacto associado à DA, uma vez que se trata de uma condição que transcende os limites da biologia para se tornar um problema social, econômico e ético (Morrisey e Coakley, 1999; Chiong *et al.* 2021). O cuidado com pacientes com a DA demanda recursos intensivos, afeta diretamente redes familiares e impacta sistemas públicos e privados de saúde (Sadik e Wilcock, 2003; Feter e Leite, 2021), estimando-se que o custo global com demência ultrapasse 1 trilhão de dólares anualmente, e esse impacto tende a dobrar até 2030 (Figura 2) (Aliberti *et al.* 2024). Além disso, o luto antecipado vivido pelas famílias que assistem, impotentes, à perda gradual da identidade e autonomia de seus entes adiciona uma dimensão emocional frequentemente invisível às estatísticas.

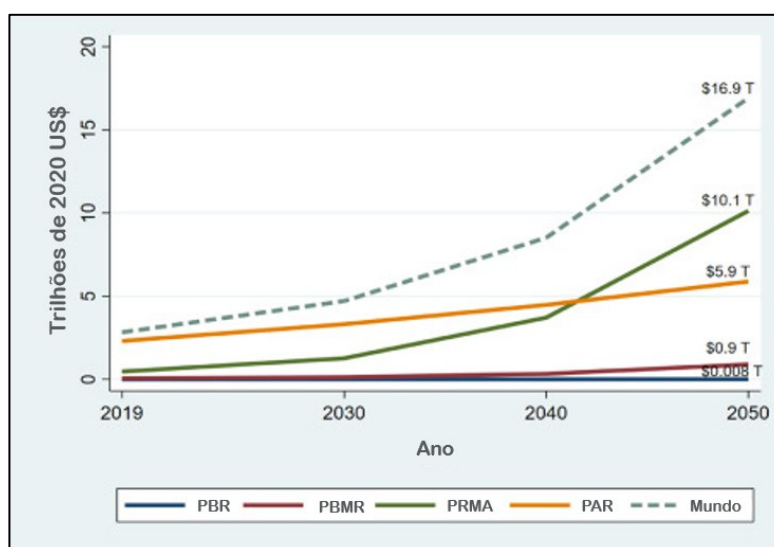


Figura 2. Projeção do custo global com demência entre 2019 e 2050, discriminada por nível de renda dos países: PBR (Países de Baixa Renda), PBMR (Países de Baixa e Média Renda), PRMA (Países de Renda Média-Alta), PAR (Países de Alta Renda) e Mundo.

Fonte: Adaptado de Nandi *et al.* (2022), *The Lancet*.

Já a epidemiologia da DA revela nuances complexas que refletem a interação entre fatores biológicos, ambientais e sociais. Embora o aumento da longevidade seja frequentemente apontado como principal determinante, evidências recentes indicam que mecanismos hormonais, imunológicos e epigenéticos também desempenham papéis relevantes na vulnerabilidade ao desenvolvimento da doença (Breeze *et al.* 2024; Ramakrishnan *et al.* 2024). Além disso, determinantes socioculturais, como desigualdade educacional e diferenças no acesso à estimulação cognitiva ao longo da vida, influenciam a formação da reserva cognitiva e a resiliência cerebral frente aos danos neurodegenerativos, evidenciando uma estreita intersecção entre neurobiologia e fatores sociais da saúde (Roe *et al.* 2008; Han *et al.* 2025).

Paralelo a isso, o cenário nacional impõe, ainda, desafios adicionais. No Brasil, a ausência de políticas públicas estruturadas de triagem e acompanhamento precoce limita as oportunidades de intervenção antes que os déficits se tornem irreversíveis. O diagnóstico ainda é, em grande parte, clínico e tardio, dificultando a implementação de estratégias terapêuticas que dependem de janelas precoces de neuroplasticidade preservada (Jaeger *et al.* 2021). Concomitantemente, a escassez de centros especializados fora dos grandes centros urbanos e a baixa cobertura de exames biomoleculares agravam o subdiagnóstico e retardam o acesso ao cuidado (Calil *et al.* 2020).

Do ponto de vista neuropatológico, a DA pode ser classificada em duas formas principais: a doença de Alzheimer esporádica (DAe) e a doença de Alzheimer familiar (DAf). Esta última caracteriza-se por início antes dos 60 anos, motivo pelo qual também é denominada DA de início precoce. A DAf apresenta forte componente genético e corresponde à forma menos comum da doença, abrangendo aproximadamente 1% a 6% dos casos (Scholz e Cobos, 2024).

Ou seja, a DAe é a forma que mais acomete as pessoas no mundo, sendo comumente associada à senilidade por atingir, majoritariamente, pessoas acima dos 60 anos de idade. Contudo, apesar das diferenças relatadas entre os dois tipos de

DA, o comprometimento das funções cognitivas é igualmente presente em ambas as formas da doença (Scholz e Cobos, 2024).

No que se refere aos aspectos cognitivos da DA, a progressão da doença se divide em três estágios de comprometimento: inicial, moderado e avançado. No primeiro, os indivíduos apresentam alterações de memória em caráter episódico, além do início do prejuízo de linguagem e comunicação (afasias primárias); no segundo estágio, os autores apontam para comprometimentos que passam a impactar a vida cotidiana do indivíduo, com funções executivas e capacidade de resolução de problemas reduzidos; e, por fim, no terceiro estágio, a perda da autonomia e independência, de modo que o paciente torna-se incapaz do autocuidado, incluindo atividades básicas do cotidiano, como alimentar-se, culminando na necessidade de auxílio constante (Cummings *et al.* 2020). Outras funções cognitivas também são afetadas com a progressão da doença, como a linguagem, prejuízo da fluência verbal e a dificuldade para evocar memórias antigas (Cummings *et al.* 2020).

Na DA, a principal característica histopatológica é o acúmulo de material fibroso insolúvel no encéfalo, tanto extracelularmente (placas senis) quanto intracelularmente (emaranhados neurofibrilares) (de Sá Cavalcanti e Engelhardt, 2012). Classicamente, associa-se tais alterações ao desenvolvimento dos sinais e sintomas da doença e à degeneração pronunciada de neurônios colinérgicos, porém, ainda que esses marcadores histopatológicos permaneçam centrais no diagnóstico e compreensão da doença, há um entendimento crescente de que eles não explicam, isoladamente, a complexidade do quadro clínico (Henstridge *et al.* 2019).

Na DA, a maciça perda sináptica e morte neuronal são observadas nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral e o hipocampo (Henstridge *et al.* 2019). O acúmulo de emaranhados neurofibrilares (ENFs) foi descrito em estruturas tais como a região CA1 do hipocampo, o córtex entorrinal, neocórtex e diversas áreas subcorticais, incluindo a amígdala, o núcleo basal de Meynert, área tegmental ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*), núcleo dorsal da rafe, bulbo olfatório e núcleos talâmicos e hipotalâmicos (DeTure e Dickson, 2019).

Com a progressão da doença há perda dos prolongamentos neuronais e comprometimento de seu entorno e atrofia cerebral, com diminuição no peso e volume

encefálico (Gomez-Isla *et al.* 1996), levando ao comprometimento da conectividade, prejuízos metabólicos e inefetividade da recuperação neuronal (Zheng *et al.* 2019).

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos no processo degenerativo observado na DA, diversas hipóteses foram postuladas. A mais clássica é a hipótese da “Cascata Amiloide” (Figura 3) (Behl, 2024). Segundo esta hipótese, a proteína beta-amiloide ($A\beta$) deriva da clivagem da proteína precursora amiloide (PPA), uma glicoproteína transmembranar presente nas membranas neurais, envolvida em processos neurais de neuroplasticidade e em funções protetoras dentro do sistema imunológico (Korte, 2019). Assim, a clivagem de PPA é realizada por meio de duas vias metabólicas que, em situações homeostáticas, não culminam na síntese do peptídeo $A\beta$. Nesse caso, a clivagem é realizada pela enzima α -secretase e seu produto é posteriormente clivado pela γ -secretase, gerando um peptídeo pequeno e solúvel com função neuroprotetora, sendo esta, portanto, a via não amiloidogênica. Já na via amiloidogênica, a PPA é clivada pela β -secretase e, em seguida, pela γ -secretase, dando origem a um peptídeo com uma sequência de $A\beta_{40}$ ou $A\beta_{42}$ aminoácidos, com características de insolubilidade e predisposição para agregação (Antony *et al.* 2025). De acordo com a hipótese da cascata amiloide, é a partir da agregação do peptídeo $A\beta$ que se inicia o processo de desregulação da atividade de quinases e fosfatases, hiperfosforilando a proteína tau (Pagnon de la Vega *et al.* 2021).

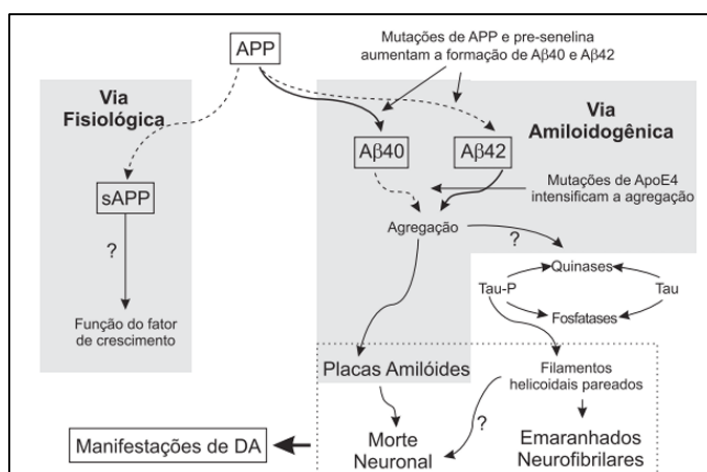


Figura 3. Hipótese da Cascata Amiloide na Doença de Alzheimer.

Fonte: Ferreira *et al.* (2008), *Revista Latino-Americana de Enfermagem*.

Do ponto de vista farmacológico, os tratamentos disponíveis atualmente para a DA são baseados no mecanismo de inibição da enzima acetilcolinesterase. Os inibidores da acetilcolinesterase (AChEI) (rivastigmina, donepezil e galantamina) alteram a função colinérgica central ao inibirem as enzimas que degradam a acetilcolina (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores colinérgicos cerebrais ao manter-se por mais tempo na fenda sináptica (Sridhar, 2022).

O donepezil, a galantamina e a rivastigmina são eficazes no tratamento de indivíduos com a DA em estágios inicial a moderado, embora possuam algumas diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Tabela 1). Os AChEI são normalmente bem tolerados, apesar dos efeitos sobre o trato gastrointestinal, tais como náuseas, vômitos, diarreia e anorexia, que são os efeitos adversos mais comuns (Hansen *et al.* 2008; Lockhart *et al.* 2009).

A memantina é um fármaco antagonista não competitivo de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato). O seu mecanismo de ação preciso permanece incerto, mas hipotetiza-se que esteja associado à redução do efeito excitotóxico do glutamato (Saeedi e Mehranfar, 2022), sendo o seu uso indicado em estágios moderados a avançados da DA (Sterpu, 2020).

Em pacientes em estágios mais avançados da DA é preconizado o uso da associação da memantina com um AChEI (Domink *et al.* 2019). Isto porque a memantina bloqueia a neurotoxicidade mediada pela atividade excessiva dos receptores NMDA, bloqueando as correntes sinápticas excitotóxicas, enquanto não interfere na neurotransmissão glutamatérgica normal em razão de seu antagonismo não competitivo de baixa afinidade pelos receptores NMDA (Domink *et al.* 2019).

Tabela 1. Vias de administração, dose, aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos e efeitos adversos dos fármacos aprovados para o tratamento da DA.

Fármaco	Dose e Administração	Mecanismo de Ação	Farmacocinética	Efeitos Adversos
Donepezil	Comprimido oral de liberação imediata e desintegrante oral Dose inicial 5mg/dia Aumentar após 1 mês para dose de manutenção 10mg/dia	Inibidor reversível não competitivo da acetilcolinesterase.	Ligação a proteínas: principalmente ligado a proteínas. Metabolismo: hepático, via CYP2D6 e CYP	Náuseas, vômitos, perda de apetite, perda de peso, diarreia, bradicardia, bloqueio cardíaco, tonturas, síncope, insônia, fadiga, sonolência dor de

	Liberação sustentada oral.		3A4; 2 ativos e 2 metabólitos inativos. Meia-vida: 70 horas	cabeça, câimbras musculares, relatos raros de rabdomiólise e síndrome neuroléptica maligna.
Rivastigmina	<i>Oral:</i> Dose inicial 1,5 mg com as refeições, Aumentar para 3 mg diariamente a cada 2 semanas para a dose de manutenção de 6 mg. <i>Adesivo transdérmico:</i> Dose inicial de 4,6mg. Aumente não antes de 4 semanas para o adesivo de 9,5 mg/dia e então para a dose máxima de 13,3 mg/dia.	Inibidor de acetilcolinesterase e butilcolinesterase	Ligação às proteínas: 40%. Metabolismo: hidrolisado no cérebro, depois metabólito processado posteriormente no fígado independente do sistema CYP e então eliminado na urina. Meia vida: 1,5 horas (oral), 3 horas (após a remoção do adesivo), mas o efeito clínico se mantém por volta de 10 horas devido à natureza pseudo-irreversível da inibição.	Náuseas, vômitos, diarreia, perda de apetite, dor abdominal, perda de peso, irritação no local de aplicação (adesivo), dermatite alérgica rara reação de hipersensibilidade, bradicardia, bloqueio cardíaco, tontura, síncope, quedas, insônia, fadiga, dor de cabeça e tremor.
Galantamina	<i>Liberação oral imediata:</i> Dose inicial de 4mg, aumentar em 8mg diariamente a cada 4 semanas até a dose de manutenção de 12mg. <i>Liberação oral estendida:</i> Dose inicial 8mg diários, aumentar em 8mg diários a cada 4 semanas até a dose de manutenção de 24mg diários.	Inibidor competitivo reversível da acetilcolinesterase e modulador do receptor nicotínico da acetilcolina.	Ligação de proteína: baixa. Metabolismo: hepático via CYP2D6 Meia-vida: 7 horas	Náusea, vômito, diminuição do apetite, perda de peso, diarreia, dor abdominal, bradicardia, bloqueio cardíaco, tonturas, síncope, quedas, hipersensibilidade rara
Memantina	Titulação inicial de <i>liberação imediata:</i> Semana 1: 5mg diariamente; Semana 2: 5mg; Semana 3: 10mg; Semana 4 e depois: 10 mg. <i>Liberação sustentada:</i> dose inicial: 7mg ao dia; aumente semanalmente em incrementos de 7 mg para dose de manutenção de 28mg	Antagonista NMDA não competitivo	Ligação às proteínas: 45% Metabolismo: quase 50% excretados inalterados na urina; restante sofre metabolismo hepático independente do sistema CYP	Geralmente bem tolerado sem padrão consistente de efeitos adversos; por exemplo, a rotulagem da embalagem inclui hipertensão e hipotensão, obstipação e diarreia foram notificadas, além de reações raras de hipersensibilidade.

diários. Disponível em combinação com Donepezil.	Meia-vida: 60-80 horas
--	---------------------------

Fonte: Adaptado de Joe e Ringman (2019), *British Medical Journal*.

Apesar dos avanços incrementais proporcionados pelas terapias atualmente disponíveis, é importante ressaltar que essas abordagens permanecem majoritariamente sintomáticas e apresentam capacidade limitada de modificar de forma clinicamente relevante o curso natural da doença de Alzheimer, sobretudo nos estágios já sintomáticos (Bermejo-Pareja e del Ser, 2025; Frisoni *et al.* 2025).

No âmbito da estratégia colinérgica, esforços farmacológicos adicionais foram conduzidos com o objetivo de otimizar propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, incluindo o desenvolvimento de derivados semissintéticos e pró-fármacos da galantamina, como o benzgalantamine (Singh *et al.* 2024). Contudo, apesar de um racional farmacológico consistente e de melhorias incrementais em parâmetros de tolerabilidade e exposição sistêmica, essas estratégias não resultaram em ganhos clínicos substanciais capazes de alterar de maneira significativa a progressão da doença (Frisoni *et al.* 2025).

De forma semelhante, as terapias com potencial modificador da doença, particularmente os anticorpos monoclonais direcionados contra a β -amiloide, como aducanumabe e lecanemabe, embora tenham ampliado o arsenal terapêutico e demonstrem eficácia consistente na redução da carga amiloide cerebral, esses agentes estão associados a benefícios cognitivos modestos, além de apresentarem limitações relevantes de segurança, como a ocorrência de edema cerebral e micro-hemorragias detectáveis por ressonância magnética, além obstáculos regulatórios e econômicos que se opõem à sua ampla implementação clínica (Chundu *et al.* 2025).

Essas limitações tornam sua aplicabilidade clínica restrita a populações altamente selecionadas, sendo particularmente relevantes em contextos como o brasileiro, onde questões de custo, infraestrutura diagnóstica e incorporação regulatória representam barreiras adicionais altamente relevantes (Barbosa *et al.* 2024).

Em conjunto, esse corpo de evidências sugere que o atual cenário terapêutico da doença de Alzheimer reflete menos uma lacuna de conhecimento mecanístico e

mais um esgotamento das abordagens centradas em alvos moleculares únicos, reforçando a necessidade de estratégias terapêuticas que integrem vias fisiopatológicas alternativas e complementares (Zhang *et al.* 2025). Entre eles, a neuroinflamação sustentada, o papel da glia reativa, o metabolismo energético cerebral e a disfunção sináptica precoce (Preeti *et al.* 2022; Yu *et al.* 2024).

Atualmente, diversos trabalhos têm apontado para um papel crítico de alterações metabólicas, imunológicas e gliais, particularmente nos estágios iniciais da doença, revelando marcadores precoces de inflamação neuroglial, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e desequilíbrio na sinalização purinérgica tanto em pacientes com a DA como em modelos animais (Kolay *et al.* 2024; Dai *et al.* 2023). Nesse cenário, o conceito de uma “tríade patológica” que integra disfunção sináptica, neuroinflamação e alterações metabólicas tem ganhado atenção, desafiando abordagens unidimensionais centradas exclusivamente em proteínas mal conformadas.

Durante décadas, o foco da pesquisa sobre a DA concentrou-se quase exclusivamente em neurônios, com ênfase nas disfunções sinápticas, perda celular e acúmulo de proteínas neurotóxicas como beta-amiloide e tau hiperfosforilada (Crimins *et al.* 2013; Rajmohan e Reddy, 2017; Torres *et al.* 2021). No entanto, um crescente número de evidências reposiciona a glia, em especial astrócitos e micróglia, como protagonistas funcionais na progressão e modulação da neurodegeneração. No contexto da DA, diversos estudos relatam que essas células não apenas respondem ao dano, mas influenciam ativamente os desfechos clínicos por meio de mecanismos altamente dinâmicos, tornando-se alvos farmacológicos viáveis e promissores (Deng *et al.* 2023; Ferrari-Souza *et al.* 2023; Wu e Eisel, 2023).

Em condições fisiológicas, os astrócitos mantêm a homeostase iônica e metabólica, regulam a transmissão sináptica, promovem a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores como glutamato e GABA e contribuem para a manutenção da barreira hematoencefálica (Kofuji e Araque, 2021). Já a micróglia atua como uma célula sentinela, monitorando o ambiente extracelular em busca de sinais de dano, liberando mediadores tróficos ou inflamatórios conforme o ambiente de o estímulo (Colonna e Butovsky, 2017). Ambos os tipos celulares são capazes de transitar

rapidamente entre estados funcionais distintos, um fenômeno conhecido como plasticidade fenotípica glial (Escartin *et al.* 2021).

Já na DA, essa plasticidade é exacerbada. Os astrócitos assumem um fenótipo reativo hipertrofiado (*astrogliosis*), caracterizado por alterações morfológicas como a expansão dos prolongamentos e a superexpressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP); além de haver mudanças funcionais que incluem o comprometimento da captação de glutamato, liberação de citocinas pró-inflamatórias e reorganização dos contatos com sinapses e capilares (Escartin *et al.* 2021; Salvadó *et al.* 2022). Em paralelo, a micróglia passa de um estado de vigilância para um perfil pró-inflamatório, com liberação de fatores citotóxicos como IL-1 β , TNF- α e espécies reativas de oxigênio (EROs), além da ativação de complexos inflamatórios como o inflamassoma NLRP3 (*NLR Family Purin Domain Containing 3*) (Fan *et al.* 2023).

Essas respostas, inicialmente adaptativas, tornam-se disfuncionais ao se perpetuarem em um estado inflamatório crônico. A neuroinflamação sustentada não apenas contribui para a perda sináptica e neuronal, mas também interfere diretamente na plasticidade sináptica e nos circuitos associados à memória. Diversos estudos experimentais demonstraram que o bloqueio farmacológico de vias inflamatórias gliais, tais como a via NF- κ B ou mecanismos de liberação de IL-1 β , pode atenuar déficits cognitivos, modular a expressão de receptores sinápticos e restaurar o equilíbrio excitatório/inibitório no hipocampo (Benmamar-Badel *et al.* 2020; Fan *et al.* 2023).

Essa relevância funcional posiciona a glia como um dos alvos terapêuticos mais versáteis para o tratamento de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a DA. Paralelamente às abordagens tradicionalmente centradas em alvos neuronais, intervenções voltadas à modulação da função glial têm ganhado destaque na literatura pré-clínica. Estudos em modelos animais de doença de Alzheimer demonstram que estratégias capazes de atenuar a reatividade glial exacerbada, restaurar estados fisiológicos ou modular a resposta imune estão associadas a melhorias em parâmetros inflamatórios, sinápticos e cognitivos (Cirillo *et al.* 2015; Smit *et al.* 2021). Ademais, o fato de que alterações gliais antecedem, em muitos casos, o declínio sináptico e cognitivo reforça seu potencial como marcador precoce e ponto de intervenção terapêutica.

Finalmente, deve ser destacado que o sistema glial também apresenta especificidades farmacodinâmicas, com expressão diferencial de receptores, canais iônicos e transportadores que não estão presentes em neurônios (Cegielski *et al.* 2022). Intervenções direcionadas à glia, portanto, não apenas representam um novo horizonte terapêutico, mas reconfiguram o entendimento fisiopatológico da DA como uma condição da rede neuroglial, e não apenas neuronal.

Astrócitos e micróglia, as principais células efectoras da resposta glial, detectam alterações no microambiente neural e respondem com um conjunto coordenado de mudanças fenotípicas, que incluem alterações morfológicas, liberação de citocinas, remodelação sináptica e interferência nos circuitos de plasticidade (Wang *et al.* 2021). Inicialmente, essas mudanças são adaptativas e visam restaurar a homeostase tecidual, no entanto, quando mantidas de forma crônica, tornam-se disfuncionais, estabelecendo um ciclo de retroalimentação inflamatória que acelera a perda sináptica, compromete a função neuronal e consolida o declínio cognitivo (Yu *et al.* 2023).

A partir daí, o cérebro, antes interpretado como um órgão relativamente imune a respostas inflamatórias clássicas, revela-se como um ambiente altamente sensível a perturbações imunes locais. O estado inflamatório sustentado não ocorre, portanto, de forma isolada, mas frequentemente se associa a alterações no metabolismo cerebral, sugerindo que a DA deve ser compreendida de maneira mais ampla, integrando disfunção imune, energética e sináptica.

Nesse contexto, ganha destaque o conceito emergente de que a DA pode ser considerada uma forma de “diabetes tipo 3”, termo proposto para descrever um quadro de resistência insulínica e comprometimento do metabolismo da glicose restrito ao SNC (Meng *et al.* 2025). Evidências histopatológicas e moleculares demonstraram que há redução na expressão de receptores de insulina, diminuição da atividade da via PI3K/Akt e aumento de marcadores de estresse oxidativo no SNC de pacientes com a DA (Shen *et al.* 2022). Para além disso, trabalhos recentes da literatura apontam que a resistência à insulina cerebral compromete diretamente a plasticidade sináptica, a bioenergética mitocondrial e os mecanismos de reparo celular, agravando os efeitos deletérios das lesões estruturais clássicas da doença (Meng *et al.* 2025).

A intersecção entre neuroinflamação e disfunção metabólica é particularmente crítica. A resistência à insulina no cérebro intensifica a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, ativa o inflamassoma NLRP3 e promove a fosforilação de tau e a produção de EROs (Ponce-Lopez *et al.* 2023), potencializando a neurotoxicidade. Concomitante a isso, a inflamação crônica compromete os sistemas de transporte de glicose, desregula receptores acoplados à insulina e impede a resposta adaptativa neuronal a condições de estresse (Nandipati *et al.* 2017). Este ciclo vicioso de inflamação e déficit energético cria um ambiente propício à degeneração neuronal progressiva, reduzindo a eficácia de tratamentos sintomáticos e comprometendo a resposta terapêutica. Assim, qualquer abordagem farmacológica verdadeiramente modificadora da doença deve considerar a interrupção simultânea desses dois eixos patológicos.

Diante deste cenário, ganham destaque modelos experimentais capazes de mimetizar de maneira integrada esses componentes neurogliais e metabólicos. Um dos modelos mais amplamente utilizados é o modelo induzido pela infusão intracerebroventricular (i.c.v) de estreptozotocina (STZ). Quando administrada em doses subdiabetogênicas diretamente no SNC, a STZ desencadeia um quadro consistente de resistência insulínica cerebral, hipoatividade da via PI3K/Akt, redução do transporte de glicose, estresse oxidativo e, sobretudo, ativação glial exacerbada (Grünblatt *et al.* 2007; Kamat *et al.* 2016). Em conjunto, estes achados demonstram a capacidade do modelo em mimetizar os eventos observados na DA esporádica, tanto em termos comportamentais quanto bioquímicos e morfológicos, o que justifica o seu uso crescente como ferramenta translacional (Villar *et al.* 2021).

A administração de i.c.v de STZ reproduz os déficits de memória de curto e longo prazo (Sharma e Gupta, 2001; Villar *et al.* 2021), a desregulação de marcadores sinápticos como a proteína de densidade pós-sináptica-95 (PSD-95) e sinaptofisina (Shan *et al.* 2010), e o aumento na expressão de GFAP e da molécula de adaptação de ligação ionizada de cálcio 1 (Iba-1) (Rai *et al.* 2014), indicando astrogliose e microgliose reativas. Além disso, o modelo induz a elevação de citocinas inflamatórias e ativação de receptores inflamatórios como o receptor do tipo Toll 4 (TLR4) e o P2X7, um receptor de canal iônico ativado por ATP extracelular (Souza *et al.* 2017), além de comprometer a indução de potenciação de longa duração (LTP) (Li *et al.* 2016;

Hashemi-Firouzi *et al.* 2017), sinalizando prejuízo funcional na plasticidade sináptica. Do ponto de vista farmacológico, o modelo ICV-STZ tem se mostrado altamente responsivo à intervenção com compostos imunomoduladores e antioxidantes (Naghizadeh *et al.* 2013), o que reforça seu valor como plataforma de triagem pré-clínica para terapias voltadas à modulação glial e restauração da homeostase energética e sináptica.

Adicionalmente, o modelo i.c.v de STZ permite investigar a interface entre a neuroinflamação e o metabolismo cerebral, ampliando a compreensão sobre os estágios iniciais da neurodegeneração. E, nesse contexto, torna-se possível avaliar não apenas a eficácia de fármacos candidatos, mas também seus mecanismos de ação sobre alvos celulares como astrócitos, micróglia e receptores purinérgicos, abrindo espaço para abordagens farmacológicas mais refinadas e com maior aplicabilidade clínica.

Esse cenário multifatorial de neurodegeneração demanda alvos terapêuticos que operem em interseções críticas entre vias inflamatórias, bioenergéticas e sinápticas. Entre esses alvos, o sistema purinérgico se destaca como um eixo de sinalização altamente conservado, responsivo a alterações no ambiente extracelular e funcionalmente distribuído entre neurônios, astrócitos, micróglia e células endoteliais (Dragić *et al.* 2020; Naffaa, 2025). A liberação de nucleotídeos, especialmente ATP, em resposta a lesões, alterações metabólicas ou hiperexcitabilidade neuronal, transforma o ATP extracelular de metabólito energético em um sinalizador de alarme e comunicação intercelular, uma vez que tal sinalização purinérgica, quando desregulada, contribui para estados patológicos sustentados, como a inflamação crônica observada na DA (Burnstock, 2015; Merighi *et al.* 2021).

Dentre os receptores purinérgicos, o subtipo P2X7 (P2X7R) tem atraído crescente interesse por sua dupla capacidade de modular tanto processos inflamatórios quanto funções sinápticas (Burnstock e Knight, 2018). Diferente de outros receptores P2X, o P2X7R apresenta um alto limiar de ativação, exigindo concentrações elevadas de ATP, típicas de ambientes lesados ou metabolicamente comprometidos, para ser ativado (Burnstock e Knight, 2018). Uma vez ativado, o P2X7R forma poros não seletivos de alto peso molecular, promovendo o influxo de íons cálcio e sódio, além de desencadear cascatas inflamatórias robustas, como a

ativação do inflamassoma NLRP3, liberação de IL-1 β e amplificação da resposta microglial (Di Virgilio *et al.* 2017).

No contexto glial, a relevância do P2X7R torna-se ainda mais evidente. Em astrócitos, sua ativação está associada à liberação de glutamato e citocinas pró-inflamatórias, alterando a excitabilidade sináptica e contribuindo para a excitotoxicidade (Zhao *et al.* 2021). Em micróglia, o P2X7R atua como sensor de dano, promovendo a transição para um estado fenotípico inflamatório e estimulando a produção de mediadores inflamatórios (Illes, 2020). É justamente esse perfil funcional que coloca o P2X7R como um ponto de convergência entre neuroinflamação, disfunção sináptica e falência energética, os três pilares que sustentam o modelo i.c.v de STZ e o processo neurodegenerativo da DA.

Foi demonstrado previamente que o bloqueio farmacológico do P2X7R, por meio de antagonistas seletivos como o *Brilliant Blue G* (BBG), é capaz de atenuar a ativação glial, reduzir a liberação de citocinas, preservar a integridade sináptica e restaurar a função cognitiva em modelos experimentais de neurodegeneração (Chen *et al.* 2014). Tais efeitos não se limitam à supressão da inflamação: o bloqueio do P2X7R participa da remodelação morfológica astrocitária, modulando a arborização glial e a densidade de marcadores como GFAP e Iba-1, além de promover uma reorganização funcional compatível com a restauração da plasticidade neural (Franke *et al.* 2012). De especial importância para o presente estudo, estudos prévios utilizando o modelo de DA induzido por STZ demonstraram que a administração de BBG está associada à prevenção de déficits comportamentais, à restauração da indução de LTP e à modulação da resposta glial exacerbada, sugerindo um potencial papel neuroprotetor do antagonismo do receptor P2X7 nesse contexto experimental (Carmo *et al.* 2014).

Os estudos apresentados na Tabela 2 foram selecionados a partir de buscas direcionadas nas bases de dados PubMed, Web of Science e Scopus, utilizando combinações dos descritores “*Alzheimer’s disease*”, “*purinergic system*”, “*P2X7 receptor*”, “*neuroinflammation*” e “*Brilliant Blue G*”. Foram incluídos estudos experimentais *in vitro*, estudos pré-clínicos em modelos animais e ensaios clínicos que investigaram a modulação do sistema purinérgico no contexto da DA ou de

mecanismos fisiopatológicos diretamente relacionados, como neuroinflamação, disfunção sináptica e neurodegeneração.

Tabela 2. Evidências experimentais e clínicas da modulação do sistema purinérgico na DA e modelos relacionados.

Referência	Tipo de Estudo	Modelo	Intervenção	Principais Desfechos
Skaper <i>et al.</i> 2006	<i>in vitro</i>	Ativação de neurônios e micróglias	BBG	↓ Neurotoxicidade mediada por micróglias; ↓ EROs/estresse oxidativo; ↑ viabilidade neuronal
Iwamaru <i>et al.</i> 2012	Animal	Lesão neurológica	BBG	↓ ativação microglial (Iba-1) e citocinas pró-inflamatórias; ↓ perda neuronal; e melhora funcional.
Martin <i>et al.</i> 2018	Animal	Camundongos transgênicos para APP	<i>Knockout</i> (deleção)	↓ carga/placas Aβ; melhora em testes cognitivos; melhora de plasticidade sináptica (LTP)
Francistiová <i>et al.</i> 2020	Animal	Modelo experimental de DA	Antagonismo	↓ depósitos Aβ; ↓ tau fosforilada; ↓ IL-1β/NLRP3-inflamassoma; melhora em memória/aprendizado
Soni <i>et al.</i> 2024	Clínico	Ensaio de fases I-II	Antagonismo seletivo de P2X7R (JNJ-54175446, GSK1482160, AZD9056, CE-224,535)	Segurança/tolerabilidade; sinais de modulação inflamatória (citocinas periféricas/biomarcadores).

Do ponto de vista farmacológico, o P2X7R reúne características desejáveis em um alvo terapêutico, incluindo ampla distribuição em células diretamente envolvidas na fisiopatologia da DA, ativação preferencial em contextos patológicos, capacidade de modular múltiplas vias associadas à neurodegeneração e um perfil de expressão que favorece maior seletividade funcional (Huang *et al.* 2024). Ademais, sua expressão aumentada em cérebros de pacientes com DA e a correlação com biomarcadores inflamatórios reforçam sua relevância clínica (Figura 3) (Takenouchi *et al.* 2010; Maschio *et al.* 2024).

A expressão ubíqua do P2X7R em múltiplos tecidos, particularmente em células do sistema imune inato e adaptativo, bem como sua participação central na

ativação de vias inflamatórias sistêmicas dependentes de ATP extracelular, impõe considerações críticas quanto ao perfil de segurança do bloqueio farmacológico não seletivo desse alvo (Burnstock, 2016; Grassi e Salina, 2023). A inibição sistêmica do P2X7R pode resultar em modulação indesejada da resposta imune periférica, com potencial aumento da suscetibilidade a infecções e interferência em processos fisiológicos mediados pela sinalização purinérgica, incluindo a ativação de inflamassomas e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Savio *et al.* 2018). Nesse contexto, estratégias terapêuticas que privilegiem antagonistas com elevada penetração no sistema nervoso central, maior seletividade tecidual, definição rigorosa de janelas terapêuticas ou regimes de administração controlados emergem como abordagens farmacológicas relevantes para maximizar a eficácia central e minimizar efeitos adversos decorrentes da inibição do P2X7R (Illés, 2020; Ahn *et al.* 2023).

.Em conjunto, as evidências disponíveis indicam que o P2X7R representa um alvo terapêutico promissor para o desenvolvimento de intervenções que não apenas atenuem sintomas, mas atuem sobre mecanismos iniciais e progressivos da DA, especialmente aqueles associados à neuroinflamação e à disfunção sináptica. Assim, investigar o impacto do bloqueio do P2X7R no modelo ICV-STZ configura não apenas uma estratégia experimental válida, mas uma oportunidade farmacológica para compreender, em nível mecanístico, como a modulação da sinalização purinérgica e glial pode contribuir para a restauração do equilíbrio funcional de circuitos neurais comprometidos.

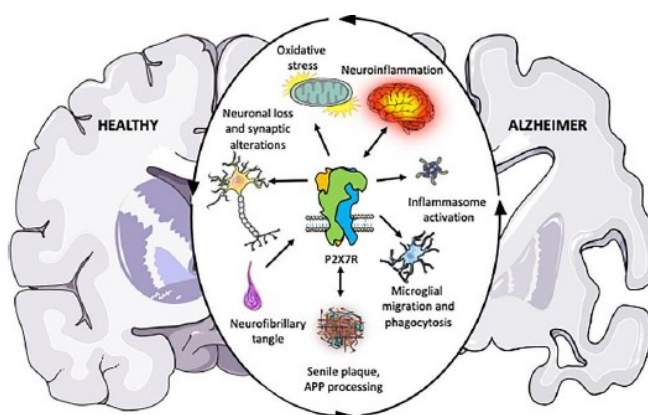


Figura 4. Representação esquemática dos variados mecanismos pelos quais o receptor purinérgico P2X7 contribui para a fisiopatologia da DA. A ativação do P2X7R em células gliais,

especialmente na micróglia, está associada à ativação do inflamassoma, à liberação de citocinas pró-inflamatórias, ao aumento do estresse oxidativo e à disfunção sináptica, culminando na amplificação da neuroinflamação e na progressão da neurodegeneração.

Fonte: Adaptado de Burnstock (2008), *Nature Reviews Drug Discovery*.

Considerando o cenário descrito, a DA representa uma doença complexa que exige abordagens terapêuticas que transcendam os paradigmas tradicionais centrados exclusivamente em neurônios e proteínas mal conformadas. A evidência crescente de que os astrócitos e as micróglias participam ativamente do curso da doença (Martin *et al.* 2019; Ronning *et al.* 2023) reposiciona a glia como um alvo terapêutico estratégico. Dentro desse novo paradigma, o receptor purinérgico P2X7 ganha relevância singular por integrar, de forma simultânea, vias inflamatórias, respostas gliais exacerbadas e alterações na plasticidade neural (Lobo *et al.* 2020).

A utilização do modelo i.c.v de STZ permite explorar esses elementos ao integrar a neuroinflamação, resistência insulínica central, disfunção sináptica e déficits cognitivos, esse modelo simula características fundamentais da DA esporádica. Ainda mais importante, possibilita a investigação de intervenções farmacológicas em fases iniciais da neurodegeneração, quando os circuitos ainda não foram completamente comprometidos e a plasticidade neural pode ser restabelecida.

Nesse contexto, o presente trabalho propôs-se a investigar os efeitos do bloqueio farmacológico do receptor P2X7 por meio da administração do antagonista seletivo BBG em um modelo animal de DA induzido por ICV-STZ. Dessa forma, o estudo não se limitou a avaliar a eficácia isolada do BBG, mas buscou investigar os efeitos do antagonismo do P2X7R sobre parâmetros gliais, sinápticos e comportamentais, contribuindo para a compreensão de como a modulação desse receptor se relaciona com processos inflamatórios, disfunção sináptica e alterações cognitivas no contexto experimental da DA.

A hipótese central desta tese foi de que o bloqueio farmacológico seletivo do receptor purinérgico P2X7, por meio da administração repetida de BBG, seria capaz de atenuar os déficits cognitivos e emocionais, a neuroinflamação e os prejuízos na plasticidade sináptica observados em modelo animal esporádico da DA, induzido por infusão i.c.v de STZ.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito neuroprotetor do antagonismo do receptor purinérgico P2X7, por meio da administração do corante BBG, sobre alterações comportamentais, bioquímicas, neuroinflamatórias, histopatológicas e eletrofisiológicas em camundongos submetidos ao modelo esporádico de DA induzida por ICV-STZ.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento com BBG sobre alterações comportamentais associadas à DA induzida por STZ, incluindo déficits cognitivos e alterações emocionais;
- Investigar o impacto do bloqueio farmacológico do receptor P2X7 sobre marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo no hipocampo e no córtex pré-frontal.
- Analisar os efeitos do tratamento com BBG sobre a resposta neuroinflamatória e a ativação glial no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DA induzido por STZ.
- Avaliar a influência do antagonismo do receptor P2X7 sobre a plasticidade sináptica e a excitabilidade neuronal no hipocampo

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos (60-90 dias de idade), das linhagens *Swiss* e C57BL/6, conforme a natureza de cada experimento. Os animais *Swiss* (25-35 g) foram obtidos a partir do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM/UFC). Esses animais foram distribuídos em coortes experimentais independentes, com aproximadamente 8-10 animais por grupo, de acordo com o delineamento de cada ensaio comportamental.

Em uma primeira coorte (C1), os animais foram submetidos aos testes de campo aberto e labirinto em Y; em uma segunda coorte (C2), aos testes de labirinto em cruz elevado e nado forçado; em uma terceira coorte (C3), ao teste de reconhecimento de objeto; e em uma quarta coorte (C4), ao teste de esquiva passiva.

Para os experimentos eletrofisiológicos conduzidos na Universidade de Coimbra (UC, Portugal), foram utilizados camundongos C57BL/6 machos adultos (60-90 dias de idade), provenientes do Biotério da própria UC, para a realização dos registros eletrofisiológicos.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (cinco animais por caixa), contendo substrato de maravalha, sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso à dieta padrão e água potável (*ad libitum*).

Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com as diretrizes éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), no Brasil; e de acordo com as Diretrizes Europeias para a Experimentação Animal (2010/63/EU). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA/UFC, protocolo nº 33300822-0; Anexo A) e pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de Coimbra (ORBEA 238/2019; 14/10/2019).

3.2 Drogas

As seguintes substâncias foram utilizadas: estreptozotocina (SIGMA-USA), *Brilliant Blue G* (SIGMA-USA), quetamina (König, Argentina), xilazina (König, Argentina). Os demais reagentes foram de grau analítico.

3.3 Modelo da Doença de Alzheimer Esporádica induzida por Estreptozotocina (STZ)

A administração i.c.v de STZ foi realizada por meio de cirurgia estereotáxica. Para tanto, os animais foram previamente anestesiados com xilazina (10 mg/kg, i.p.) associada à quetamina (100 mg/kg, i.p.), sendo em seguida posicionados em um aparelho estereotáxico (Stoelting®). Realizou-se uma incisão sagital mediana de aproximadamente 2 cm no couro cabeludo com auxílio de bisturi, a fim de expor as suturas cranianas e permitir a identificação do ponto de referência anatômico denominado bregma. Com base nesse ponto, foram realizados orifícios nos ossos do crânio, bilateralmente, utilizando-se uma microbroca de baixa rotação (Dremel®), nas seguintes coordenadas estereotáxicas: 0,5 mm posterior ao bregma, 1,1 mm lateral à sutura sagital e 2,8 mm de profundidade em relação à superfície cortical, conforme descrito por Paxinos e Franklin (2004).

Em seguida, administrou-se bilateralmente a STZ (3 mg/kg) por via i.c.v, com auxílio de uma seringa *Hamilton*. As injeções foram realizadas nos dias 1 e 3 do protocolo experimental, infundindo-se 1,5 µL da solução em cada ventrículo lateral, conforme o modelo descrito por Sharma e Gupta (2001). As microinjeções, tanto de STZ quanto do veículo, foram realizadas lentamente ao longo de 1 minuto, mantendo-se a agulha posicionada por mais 5 minutos após a infusão, a fim de evitar refluxo pela cânula.

Finalizada a administração, procedeu-se à sutura das incisões utilizando fio cirúrgico de algodão (AP 0,4 - 15x45 cm), seguido de assepsia local com solução de povidine-iodo. Os animais do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, com inserção da agulha nas mesmas coordenadas, mas receberam apenas a infusão de aCSF estéril.

3.4 Protocolo Experimental

Os animais foram alocados aleatoriamente em quatro grupos experimentais, conforme descrito a seguir, com n experimental equivalente a 10 animais por grupo:

a) aCSF + SAL – grupo submetido à cirurgia estereotáxica com administração i.c.v de fluido cérebro-espinhal artificial (aCSF) e tratado com solução salina a 0,9% por via intraperitoneal (i.p.)

b) aCSF + BBG – grupo submetido à cirurgia estereotáxica com administração de aCSF e tratado com o corante *Brilliant Blue G* (BBG) na dose de 50 mg/kg (Fonteles *et al.* 2020), por via i.p;

c) STZ + SAL – grupo submetido à cirurgia estereotáxica com administração de estreptozotocina (STZ) e tratado com solução salina a 0,9% por via i.p;

d) STZ + BBG – grupo submetido à cirurgia estereotáxica com administração de STZ e tratado com BBG (50 mg/kg, i.p.).

O tratamento com BBG ou solução salina (veículo) foi iniciado logo após a segunda sessão de indução (administração de STZ ou aCSF), sendo mantido diariamente por 15 (quinze) dias consecutivos.

Durante o período experimental, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais destinada à avaliação de parâmetros locomotores, emocionais e cognitivos. Foram utilizados os seguintes testes: campo aberto (atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso), labirinto em cruz elevado (comportamento tipo-ansioso), nado forçado (comportamento tipo-depressivo), labirinto em Y (memória de trabalho), reconhecimento de objetos (memória espacial de referência) e esquiva passiva (memória aversiva). A realização dos testes teve início no 15º dia após a segunda administração de i.c.v de STZ ou aCSF, conforme o delineamento experimental ilustrado na Figura 5.

Concluída a fase de avaliação comportamental, os animais foram eutanasiados, e os encéfalos foram removidos para dissecação das regiões do córtex pré-frontal e hipocampo. Essas áreas foram destinadas às análises de biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS e nitrito) e à avaliação histopatológica por imunohistoquímica.

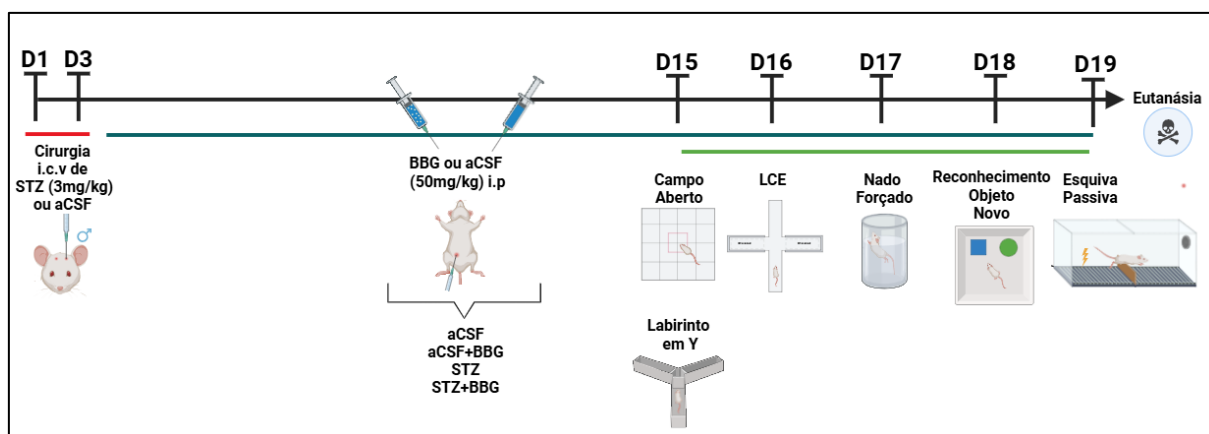


Figura 5. Delineamento experimental do protocolo de indução da DA esporádica por administração i.c.v de STZ (3 mg/kg) nos dias 1 e 3, tratamento com BBG (50 mg/kg, i.p.) a partir do dia 3, realização dos testes comportamentais entre os dias 15 e 19, e eutanásia no dia 19.

3.5 Dosagem da Glicemia

A aferição da glicemia periférica foi realizada em todos os animais incluídos no estudo, sem necessidade de jejum prévio, com o objetivo de confirmar a ausência de desenvolvimento de diabetes periférica decorrente do protocolo experimental, uma vez que o modelo de DA induzido por ICV-STZ não tem como finalidade a indução de alterações metabólicas sistêmicas. As medições foram realizadas em dois momentos experimentais: imediatamente antes do primeiro procedimento de indução (D1) e no 18º dia após a administração de STZ (D19).

Para a coleta da amostra sanguínea, foi realizada uma leve incisão na extremidade da cauda dos animais utilizando-se de tesoura cirúrgica estéril, obtendo-se uma gota de sangue capilar. A amostra foi aplicada diretamente sobre a fita reagente de um glicosímetro portátil, e os valores foram registrados em mg/dL. De acordo com critérios previamente descritos por Grieb (2015) para modelos experimentais com STZ, animais que apresentaram níveis glicêmicos superiores a 200 mg/dL, associados a peso corporal acima de 55 g, foram considerados diabéticos e excluídos do estudo, assegurando que os efeitos observados fossem predominantemente atribuídos às alterações centrais induzidas pela STZ.

3.6 Testes Comportamentais

3.6.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto, inicialmente descrito por Hall (1934) para avaliação do estado emocional em roedores, foi empregado neste estudo com base na adaptação proposta por Broadhurst (1957), com o objetivo de mensurar a atividade locomotora, o comportamento exploratório e parâmetros indiretos de comportamento do tipo ansioso em ambiente novo. A atividade exploratória, avaliada principalmente pela distância total percorrida e pela frequência de comportamentos exploratórios verticais (*rearings*), reflete o nível de familiaridade do animal com o contexto, sua reatividade ao ambiente e seu estado emocional.

A arena utilizada consistia em uma caixa quadrada de acrílico com dimensões de 30 × 30 × 15 cm, com o piso pintado de preto e subdividido em nove quadrantes de tamanhos iguais. Cada animal foi individualmente posicionado no centro da arena e permaneceu livre para explorar o ambiente durante um período de 5 minutos. Durante esse intervalo, foram registrados automaticamente, por meio do software ANY-maze (versão 4, USA), os seguintes parâmetros: distância total percorrida, velocidade média, número de cruzamentos entre quadrantes e quantidade de *rearings* (número de elevações verticais nas quais o animal apoia-se nas patas traseiras para inspecionar o ambiente). A redução da atividade exploratória, particularmente da frequência de *rearings*, foi considerada indicativa de comportamento do tipo ansioso, enquanto a distância percorrida e a velocidade média permitiram avaliar possíveis alterações motoras.

A iluminação da sala experimental foi mantida com luz vermelha (12 lux), com o intuito de minimizar o estresse ambiental. Além disso, a arena foi higienizada com solução de etanol diluído a 20% entre cada sessão, a fim de eliminar resíduos olfativos (urina e fezes) que pudessem interferir no comportamento dos demais animais.

3.6.2 Teste do labirinto em Y

O teste do labirinto em Y foi empregado com o objetivo de avaliar a memória operacional (ou de trabalho) visuoespacial, cuja principal região cerebral associada é

o córtex pré-frontal, conforme descrito por Sarter *et al.* (1997). O aparelho consiste em um labirinto de madeira formado por três braços idênticos, dispostos em ângulo de 120°, com 40 cm de comprimento, 5 cm de largura e 16 cm de altura.

Durante o teste, cada animal foi posicionado na extremidade de um dos braços e deixado livre para explorar o ambiente por um período de 8 minutos. Ao longo desse intervalo, foram registradas todas as entradas realizadas em cada um dos braços, bem como a sequência dessas entradas. O parâmetro principal avaliado foi a alternância espontânea entre os braços, definida como a entrada sucessiva em três braços diferentes, sem repetições imediatas.

O desempenho do animal foi expresso como porcentagem de alternância espontânea, calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Alternância espontânea (\%)} = \left(\frac{\text{N}^\circ \text{ de alternâncias}}{\text{N}^\circ \text{ total de entradas} - 2} \right) \times 100$$

Em que o número de sequências possíveis corresponde ao total de entradas menos dois. Altas taxas de alternância nos grupos controle indicam que os animais foram capazes de recordar os braços previamente explorados, o que é interpretado como um sinal de integridade da memória operacional (Lalonde 2002).

3.6.3 Teste de reconhecimento de objeto novo

O teste de reconhecimento de objetos baseia-se na propensão natural dos roedores à exploração de estímulos novos, comportamento descrito originalmente por Ennaceur e Delacour (1988). A familiarização dos animais com o ambiente experimental foi realizada 24 horas antes do teste, por meio da exposição à arena do campo aberto.

O experimento foi conduzido utilizando-se a mesma arena do teste do campo aberto. Na fase de treinamento, dois objetos idênticos foram posicionados nos cantos opostos da arena, e o animal foi colocado no centro, voltado para a parede oposta aos objetos, sendo então permitido explorar o ambiente por 10 minutos.

Após um intervalo de uma hora, procedeu-se à fase de teste. Um dos objetos (à direita) foi substituído por um novo estímulo, e o tempo de exploração de cada objeto (familiar e novo) foi registrado ao longo de 5 minutos. O índice de

reconhecimento (ou índice de discriminação) foi calculado conforme a seguinte equação:

$$\text{Índice de Discriminação} = \frac{T_{\text{novo}} - T_{\text{familiar}}}{T_{\text{novo}} + T_{\text{familiar}}}$$

Em que T_{novo} representa o tempo de exploração do objeto novo e T_{familiar} , o tempo de exploração do objeto previamente apresentado. Valores positivos indicam preferência pelo objeto novo, sugerindo preservação da memória de reconhecimento.

A arena e os objetos foram higienizados com solução de etanol a 20% entre cada teste, a fim de eliminar vestígios olfativos. Foram considerados como comportamentos exploratórios válidos: farejar, lambrar, tocar os objetos com o focinho ou patas anteriores, ou manter o focinho direcionado ao objeto a uma distância igual ou inferior a 1cm.

3.6.4 Teste de esquiva passiva

O teste de esquiva passiva, baseado no protocolo descrito por De Noble *et al.* (1986), tem por objetivo avaliar diferentes formas de memória, incluindo a memória de curta e de longa duração, com ênfase em conteúdos aversivos. Esse paradigma comportamental explora a tendência natural dos roedores à exploração do ambiente e sua capacidade de associar estímulos negativos a determinados comportamentos.

Para isso, os animais foram submetidos à habituação ao aparelho de esquiva passiva (Insight® LTDA), composto por uma câmara de acrílico com dimensões de 48×22×22cm. O interior do equipamento continha uma plataforma elevada, não eletrificada, posicionada acima de um piso metálico com capacidade de emissão de estímulo elétrico.

Inicialmente, cada animal foi colocado sobre a plataforma e permaneceu por 1 minuto para ambientação. Após esse período, foi retirado e, passados 30 segundos, reposicionado na plataforma. Em virtude de seu comportamento exploratório inato, ao descer da plataforma, o animal recebia um estímulo elétrico de 0,5 mA com duração de 1 segundo, sendo registrado o tempo de latência até a descida, com limite máximo de 300 segundos (fase de treinamento). Animais que não desceram espontaneamente durante esse tempo limite foram submetidos ao mesmo estímulo elétrico ao final dos 300 segundos.

Quinze minutos após o treino, os animais foram novamente colocados sobre a plataforma para avaliação da memória recente, sendo registrada a nova latência de descida. A retenção da memória de longo prazo (memória tardia) foi avaliada 24 horas após o treinamento. Nessa fase, contudo, nenhum estímulo elétrico foi aplicado, de modo a verificar a capacidade de lembrar do evento aversivo apenas por associação ambiental.

3.6.5 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é um teste comportamental validado para a avaliação de comportamentos do tipo ansioso em roedores. O princípio do teste fundamenta-se no conflito natural do animal entre a tendência exploratória e o receio de ambientes abertos e potencialmente inseguros. Assim, a exploração dos braços abertos, estruturas sem proteção lateral, é interpretada como um indicativo de comportamento exploratório prevalecente sobre o medo, sugerindo menor ansiedade (Treit, 1985; Dawson e Tricklebank, 1995; Walf e Frye, 2007).

O aparato é composto por quatro braços perpendiculares entre si: dois braços abertos (33,5 cm de comprimento × 7 cm de largura), delimitados apenas por um rebordo de 0,5cm de altura para evitar quedas, e dois braços fechados (33,5 cm × 7 cm), circundados por paredes laterais de 20 cm de altura. Ao centro, há uma plataforma de interseção com dimensões de 13,5cm × 10cm.

Antes do início do teste, os animais foram aclimatados por 30 minutos em uma antecâmara com iluminação controlada (30 ± 5 luxes). O aparelho foi posicionado a 50cm do solo, em ambiente controlado com níveis de luminosidade distintos: braços abertos (90 ± 5 luxes), braços fechados (10 ± 5 luxes) e centro (75 ± 5 luxes). O registro comportamental foi feito por uma câmera (Intelbras®) posicionada acima do aparato.

Cada animal foi colocado individualmente sobre a plataforma central, voltado para o braço aberto oposto ao experimentador, e teve seu comportamento monitorado durante 5 minutos. O aparato foi higienizado com etanol a 5% entre cada sessão para evitar interferência olfatória entre os sujeitos.

A análise dos vídeos foi realizada por um avaliador cego à identidade dos grupos experimentais, utilizando um sistema de contagem manual. A entrada do

animal em qualquer compartimento do labirinto foi considerada apenas quando as quatro patas estavam completamente dentro da área avaliada.

Os parâmetros comportamentais analisados incluíram: número total de entradas nos braços fechados, porcentagem de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos.

3.6.6 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é um teste amplamente utilizado para avaliação de comportamentos do tipo depressivo em roedores, sendo considerado um paradigma sensível para triagem de agentes com potencial antidepressivo. O teste se baseia na resposta comportamental do animal à exposição a uma situação de estresse inescapável, neste caso, um recipiente com água, induzindo um estado de imobilidade interpretado como comportamento de desesperança aprendida (Porsolt *et al.* 1977).

Cada animal foi colocado individualmente em um cilindro de vidro transparente com 25 cm de altura e 19 cm de diâmetro, preenchido com água (temperatura mantida em 25 ± 1 °C) até a altura de 15 cm, de modo a impedir que o animal tocasse o fundo com a cauda ou escapasse pelas laterais.

O teste teve duração de 6 minutos, sendo os últimos 4 minutos utilizados para análise comportamental (modelo adaptado de Porsolt *et al.* 1977), desconsiderando os dois primeiros minutos de adaptação. O comportamento dos animais foi registrado por uma câmera posicionada lateralmente e analisado posteriormente por observador cego à identidade dos grupos experimentais. A principal variável registrada foi o tempo de imobilidade, definido como a ausência de movimentos ativos de nado, sendo permitidos apenas os movimentos mínimos necessários para manter a flutuação e a cabeça fora da água.

Maior tempo de imobilidade é interpretado como um aumento do comportamento do tipo depressivo, ao passo que a redução desse tempo pode indicar efeito antidepressivo de intervenções farmacológicas ou experimentais (Slattery e Cryan, 2012). Após o teste, os animais foram secos com papel absorvente, aquecidos com auxílio de lâmpadas infravermelhas e retornados às suas gaiolas.

3.7 Medidas de Parâmetros de estresse oxidativo

3.7.1 Determinação da peroxidação lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica, indicadora de dano oxidativo às membranas celulares, foi realizada por meio da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Draper e Hadley (1990). O teste baseia-se na formação de complexos corados entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA), um dos principais produtos da degradação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs).

Para a análise, alíquotas de 60 µL dos homogenatos de córtex pré-frontal e hipocampo (preparados a 10% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) foram transferidas para tubos de ensaio e submetidas à centrifugação a 1200 rpm, a 4 °C, por 30 minutos. Em seguida, 100 µL de ácido perclórico a 35% foram adicionados para interromper a reação de peroxidação, seguida de nova centrifugação a 5000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos.

O sobrenadante obtido foi cuidadosamente separado e misturado a 50 µL de solução de ácido tiobarbitúrico a 1,2%. A mistura foi então incubada em banho-maria, à temperatura controlada entre 95 °C e 100 °C, por 30 minutos e, posteriormente, resfriada à temperatura ambiente.

Alíquotas de 150 µL da solução final foram transferidas para poços de uma placa de microtitulação (tipo ELISA), e a absorbância foi determinada a 535 nm em leitor de microplacas. A concentração de MDA foi quantificada por interpolação em curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas da substância (640; 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,2; 0,6 µM). Os resultados foram expressos em micromolar (µM) de MDA, refletindo o conteúdo de produtos de peroxidação lipídica nos homogenatos analisados.

3.7.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

A concentração de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3), biomarcadores indiretos da produção de óxido nítrico (NO), foi determinada por meio do método colorimétrico de Griess, conforme descrito por Green *et al.* (1982). Este ensaio baseia-se em uma reação de diazotização em meio ácido, na qual o nitrito presente na amostra reage com a sulfanilamida e a N-1-naftiletilenodiamina, formando um composto de coloração

rósea, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de nitrito e pode ser quantificada por espectrofotometria.

Para o preparo das amostras, homogenatos de córtex pré-frontal e hipocampo (10% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram então transferidas para poços de uma placa de microtitulação, onde se adicionaram 100 µL do reagente de Griess (solução composta por N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água destilada e sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5%, na proporção 1:1). Para a leitura de branco, utilizou-se 100 µL de tampão fosfato acrescido de 100 µL do reagente de Griess.

As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos, e a absorbância das amostras foi medida a 540 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi construída a partir de soluções de nitrito em concentrações crescentes (100; 50; 25; 12,5; 6,52; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195 µM). A equação da reta foi determinada a partir da regressão linear entre a absorbância (eixo y) e a concentração de nitrito (eixo x), sendo utilizada para interpolação dos valores das amostras. Os resultados finais foram expressos em micromolar (µM).

3.8 Processamento histológico e imunohistoquímico

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia profunda e, em seguida, perfundidos transcardiacamente via ventrículo esquerdo. A perfusão iniciou-se com solução salina gelada (8-10 °C), com a finalidade de promover a remoção do sangue, sendo posteriormente realizada a fixação tecidual por meio de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4). Após esse procedimento, os encéfalos foram cuidadosamente removidos e submetidos à pós-fixação em formaldeído tamponado por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram transferidos para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PBS e mantidos a 4°C até o processamento histológico.

Os encéfalos criopreservados foram então seccionados por microtomia em criostato rotativo (Leica CM3050 S, Heidelberg, Alemanha), mantidos à temperatura

de -20 °C, sendo obtidos cortes coronais com espessura de 30 µm, abrangendo regiões do hipocampo. Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas, com o objetivo de assegurar adequada adesão tecidual durante as etapas subsequentes. Para a caracterização da resposta neuroinflamatória hipocampal, os cortes foram submetidos a reações imunohistoquímicas utilizando-se anticorpos específicos para GFAP (marcador de astrócitos), e Iba-1 (marcador de micróglia ativada).

3.8.1 Análises imunohistoquímicas para GFAP e Iba-1

As análises imunohistoquímicas foram empregadas para avaliação da expressão de proteínas associadas à resposta neuroinflamatória. A marcação da proteína GFAP permitiu avaliar o grau de ativação astrocitária (astroglíose); e o marcador Iba-1 foi utilizado para detecção da presença e ativação de micróglia (microglíose).

As imunomarcações foram realizadas em cortes histológicos com 30 µm de espessura, obtidos do hipocampo, com espaçamento de 30 µm entre as fatias, seguindo o seguinte protocolo:

a) **Lavagem e bloqueio de peroxidase:** Os cortes foram lavados três vezes com PBS (5 minutos cada lavagem), seguidos de incubação em solução de H₂O₂ a 1,05% em metanol a 10% (preparados em PBS) por 40 minutos, à temperatura ambiente, para bloqueio da peroxidase endógena.

b) **Bloqueio proteico:** Após nova lavagem (3x por 5 minutos em PBS), os cortes foram incubados por 2 horas em solução bloqueadora contendo 10% de soro de cavalo e 1% de Triton X-100 diluídos em PBS, também à temperatura ambiente.

c) **Incubação com anticorpos primários:** As fatias foram então incubadas com anticorpos primários diluídos em PBS contendo 5% de soro de cavalo e 0,25% de Triton X-100, durante 48 horas a 4 °C, em câmara úmida. Os anticorpos utilizados foram:

- Anti-GFAP (rabbit polyclonal, 1:200, Sigma)
- Anti-Iba-1 (rabbit polyclonal, 1:300, Wako, Japão)

d) **Incubação com sistema de detecção e revelação:** Após incubação, os cortes foram lavados (3x por 10 minutos em PBS) e incubados por 2 horas com sistema de detecção secundário Dako EnVision+ (HRP, anti-rabbit e anti-mouse). A reação de coloração foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako), produzindo coloração marrom nos locais de marcação. A reação foi interrompida com lavagem em água destilada.

e) **Montagem das lâminas:** Após secagem, as lâminas foram montadas com meio permanente Entellan® (Merck, Alemanha).

Posteriormente houve a quantificação da densidade óptica das imunomarcações, utilizando-se o microscópio Nikon Eclipse E200 com aumento de 20x, 40x e 40x com imersão. Para cada animal, três cortes foram selecionados aleatoriamente e, em cada corte, três áreas foram analisadas em regiões representativas do hipocampo. A análise semiquantitativa da densidade óptica foi realizada com o software *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, EUA).

A densidade final de cada imagem foi obtida por meio da subtração da densidade do branco (fundo) da densidade total da marcação. Os valores foram expressos como média de três medições por animal. Para análise comparativa, os resultados de cada grupo experimental foram expressos em porcentagem relativa à média obtida no grupo controle (definida como 100%). Cada grupo foi composto por 8 a 10 animais.

3.9 Avaliação eletrofisiológica da LTP em fatias hipocampais

Os animais foram anestesiados com isoflurano e rapidamente decapitados. Os cérebros foram removidos e imediatamente imersos em solução de aCSF a 4 °C saturada com carbogen (95% O₂ e 5% CO₂).

Fatias coronais de 400 µm de espessura contendo o hipocampo foram obtidas utilizando um vibrátomo (Leica VT1200S). As fatias preparadas foram incubadas em solução de aCSF saturado com carbogen a 32 °C por 30 minutos e, posteriormente, mantidas à temperatura ambiente (22 - 24 °C) por pelo menos 1 hora antes dos registros.

3.9.1 Administração de STZ em fatias hipocampais

As fatias hipocampais foram alocadas em uma câmara de registro submersa, mantida a 30–32 °C, e continuamente perfundidas com aCSF saturada com carbogen a uma taxa de 2 mL/min. Após um período de estabilização de 20 minutos, foi registrado o potencial de campo excitatório (fEPSP) basal na camada radiatum da região CA1, utilizando microeletrodos de vidro preenchidos com aCSF (resistência de 2-4 MΩ).

Para os grupos experimentais, a STZ foi adicionada à aCSF na concentração de 50 µg/mL (aproximadamente 0,15 mM). A STZ foi aplicada após a estabilização do fEPSP basal, permitindo a avaliação direta de seus efeitos neurotóxicos sobre a plasticidade sináptica. As fatias foram expostas à STZ por 30 minutos, seguidos de lavagem com aCSF fresca por 10 minutos antes da indução do Potencial de Longa Duração (LTP).

A LTP foi induzida por um protocolo de tetanização de alta frequência (HFS), consistindo em duas séries de 100 pulsos a 100 Hz, com intervalo de 20 segundos entre as séries. Os fEPSPs foram monitorados por 60 minutos após a indução da LTP.

A LTP foi considerada estabelecida quando a inclinação do fEPSP se manteve ≥20% acima do valor basal por pelo menos 30 minutos. Para avaliar o efeito do STZ, comparou-se a magnitude da LTP entre os grupos controle e STZ. Uma redução de ≥30% na magnitude da LTP no grupo STZ em relação ao controle foi interpretada como indicativa de comprometimento da plasticidade sináptica.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e, antes da escolha dos testes comparativos, foi aplicado o teste de normalidade de D'Agostino e Pearson para avaliar a distribuição dos dados em cada conjunto experimental.

Nos casos em que os dados apresentaram distribuição normal, utilizaram-se testes paramétricos. Comparações entre três ou mais grupos foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida de testes *post hoc* apropriados, como Bonferroni ou Tukey, para detecção de diferenças entre os grupos experimentais. Quando o objetivo foi comparar apenas dois grupos independentes, empregou-se o teste *t* de Student para amostras não pareadas. Sempre que pertinente, a homogeneidade das variâncias foi examinada com o teste F, especialmente nos casos em que a variabilidade dos dados se mostrava relevante para a interpretação do efeito biológico.

Nos conjuntos que não seguiram distribuição normal, foram aplicados testes não paramétricos equivalentes. Comparações entre dois grupos foram conduzidas com o teste de Mann-Whitney, e comparações entre três ou mais grupos foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. A escolha do teste foi atribuída respeitando-se o comportamento estatístico dos dados, a fim de garantir que a análise refletisse com precisão as características de cada variável.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados comportamentais

5.1.1 *Teste do campo aberto*

A atividade locomotora foi avaliada por meio da distância total percorrida (crossings) durante 5 minutos de exposição à arena. Os dados foram apresentados graficamente como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), conforme ilustrado na Figura 6, e apresentaram distribuição normal em todos os grupos experimentais, de acordo com o teste de D'Agostino e Pearson ($p > 0,05$). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Todos os animais incluídos nessa coorte experimental foram considerados na análise estatística, não havendo redução do número amostral entre os grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos aCSF, STZ e STZ + BBG ($p > 0,05$), indicando que a administração de STZ, bem como o tratamento com BBG, não alteraram a atividade locomotora espontânea dos animais.

O comportamento exploratório vertical foi avaliado por meio do número de *rearings* registrados no mesmo período. Os dados, igualmente apresentados como média $\pm$ EPM (Figura 6), foram analisados por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, não sendo identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, observou-se uma tendência de aumento no número de *rearings* no grupo STZ + BBG em comparação ao grupo STZ ($p = 0,058$), sugerindo uma possível modulação do comportamento exploratório pelo tratamento com BBG, sem impacto sobre a atividade locomotora basal.

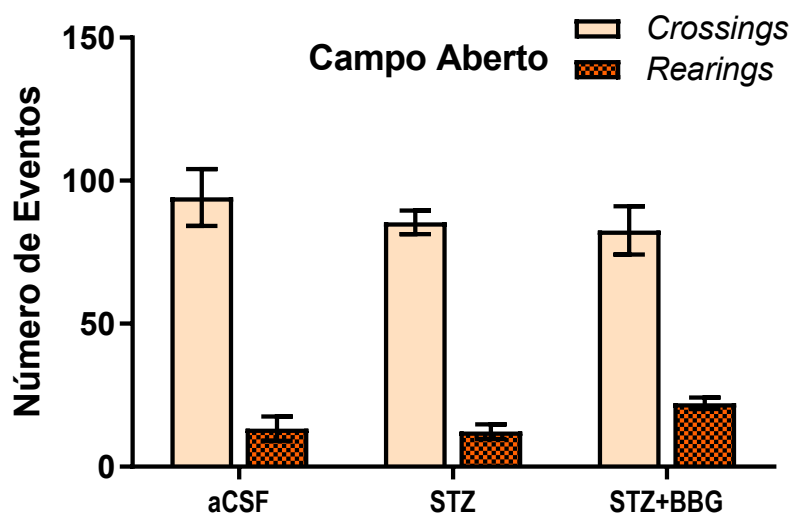


Figura 6. Distância total percorrida (*crossings*) e número de *rearings* registrados no teste do campo aberto, nos grupos aCSF, STZ e STZ + BBG. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com 10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($p > 0,05$).

5.1.2 Teste do nado forçado

Os animais submetidos ao modelo da infusão i.c.v de STZ apresentaram alterações significativas no tempo de imobilidade. A análise por ANOVA de duas vias revelou efeitos principais tanto da administração de STZ ($p = 0,0015$) quanto do tratamento com BBG ($p < 0,0001$), além de uma interação altamente significativa entre os dois fatores ($p < 0,0001$), indicando que o efeito do BBG depende da presença prévia do modelo.

De forma mais específica, os animais que receberam STZ exibiram um aumento no tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle (aCSF), com uma diferença média de 65,25 segundos ($p < 0,0001$), sugerindo um comportamento tipo-depressivo. Esse aumento também foi observado em relação ao grupo tratado com BBG isoladamente ($p < 0,0001$), reforçando a ideia de que o efeito do STZ foi revertido pelo tratamento.

Já os animais que receberam BBG após a indução com STZ (STZ + BBG) apresentaram uma redução no tempo de imobilidade em comparação ao grupo STZ, com uma diferença média de 89,74 segundos ($p < 0,0001$). Essa redução também foi

significativa quando comparada aos grupos aCSF e BBG isolado ($p = 0,0188$ e $p = 0,0083$, respectivamente), indicando que o BBG protegeu contra o efeito do STZ.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos aCSF e aCSF + BBG ($p = 0,9890$), o que sugere que o BBG, por si só, não altera o comportamento tipo-depressivo em animais sem lesão (Figura 7).

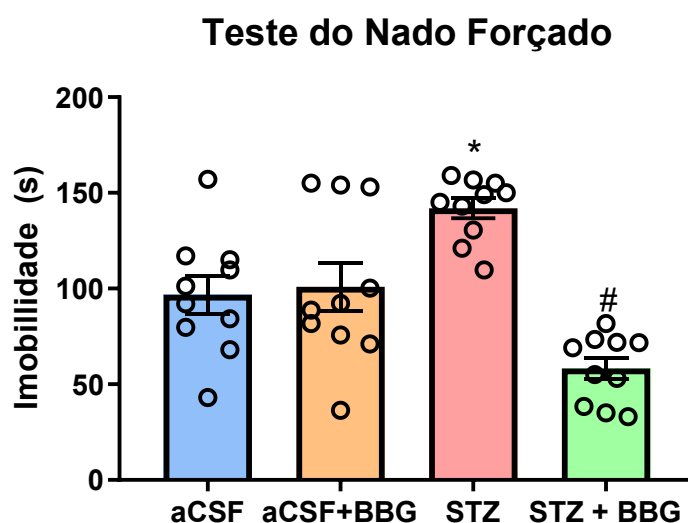


Figura 7. Efeito do tratamento com *Brilliant Blue G* (BBG) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao modelo de Doença de Alzheimer esporádica induzida por estreptozotocina (STZ). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com 10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida do teste *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo aCSF; # $p < 0,05$ em relação ao grupo STZ.

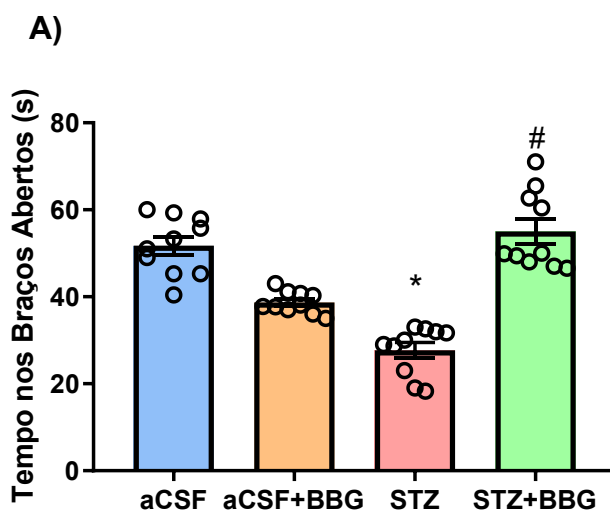
5.1.3 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

No teste do labirinto em cruz elevado (LCE), utilizado para avaliar o comportamento do tipo ansioso, inicialmente foi analisada a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA). A ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre os fatores STZ e BBG ($F(1,36) = 10,84$; $p = 0,0022$). O pós-teste de Tukey indicou que os animais do grupo STZ + BBG apresentaram maior proporção de entradas nos braços abertos em comparação aos grupos STZ ($p = 0,0041$) e aCSF + BBG ($p = 0,0093$), indicando um efeito comportamental associado ao tratamento (Figura 8A).

Em seguida, foi avaliado o tempo de permanência nos braços abertos, expresso em segundos, demonstrou que a administração i.c.v. de STZ induziu um perfil compatível com comportamento tipo-ansioso, uma vez que os animais do grupo STZ apresentaram redução significativa nesse parâmetro em relação ao grupo aCSF ($F(3,31) = 8,358$; $p = 0,0003$; Tukey $p = 0,0142$). O tratamento com BBG esteve associado a uma proteção em relação a esse comportamento, promovendo um aumento significativo de 23,84 pontos percentuais no tempo de permanência nos braços abertos em comparação ao grupo STZ ($p = 0,0004$), diferença que também se manteve em relação ao grupo aCSF + BBG ($p = 0,0073$) (Figura 8B).

Por fim, o total de entradas nos braços fechados, parâmetro indireto de atividade locomotora, foi avaliado. A análise não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), descartando a interferência de alterações motoras nos resultados observados no LCE (Figura 8C).

Em conjunto, esses resultados indicam que o modelo com STZ foi capaz de reproduzir um estado comportamental compatível com ansiedade em roedores e que a administração de BBG promoveu a normalização do comportamento exploratório no LCE.



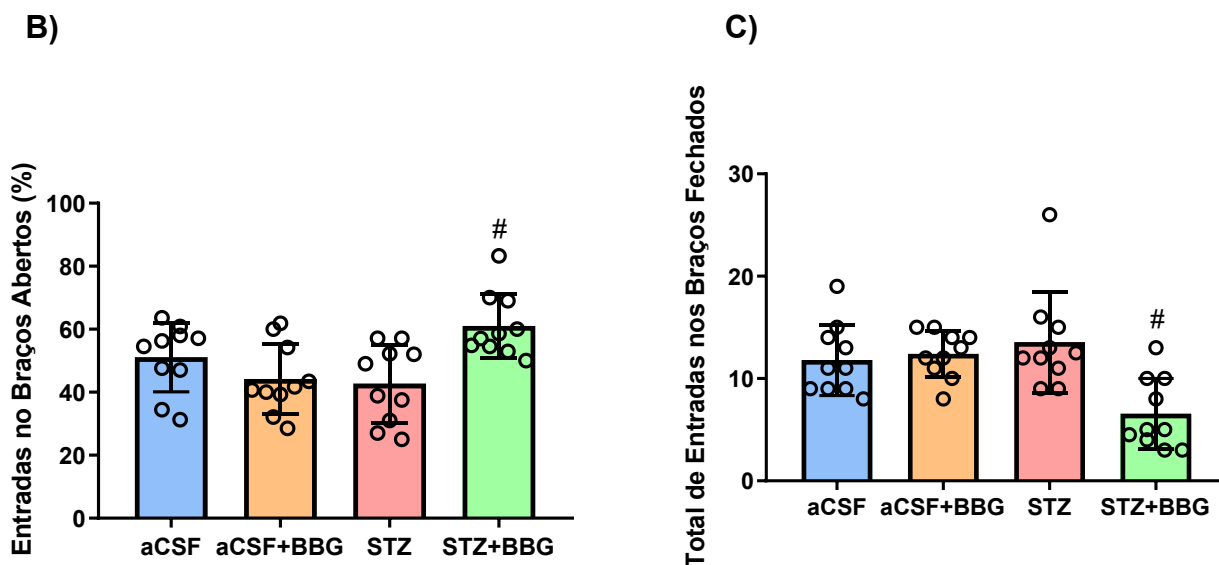


Figura 8. Avaliação de comportamento tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), realizado em camundongos submetidos à administração i.c.v de Estreptozotocina (STZ), com ou sem tratamento com *Brilliant Blue G* (BBG). A) porcentagem de entradas nos braços abertos; B) tempo de permanência nos braços abertos (em segundos); C) total de entradas nos braços fechados. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com 10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida do teste *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo aCSF; # $p < 0,05$ em relação ao grupo STZ.

5.1.4 Teste do reconhecimento de objeto novo

A avaliação da memória de reconhecimento foi realizada por meio do cálculo do índice de discriminação no teste de reconhecimento de objeto novo. Após remoção de valores considerados *outliers*, os dados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

As comparações múltiplas realizadas com o teste de Dunn também não revelaram diferenças significativas entre os grupos aCSF e STZ ($p > 0,05$), STZ e STZ + BBG ($p > 0,05$), ou entre aCSF e STZ + BBG ($p > 0,05$) (Figura 9).

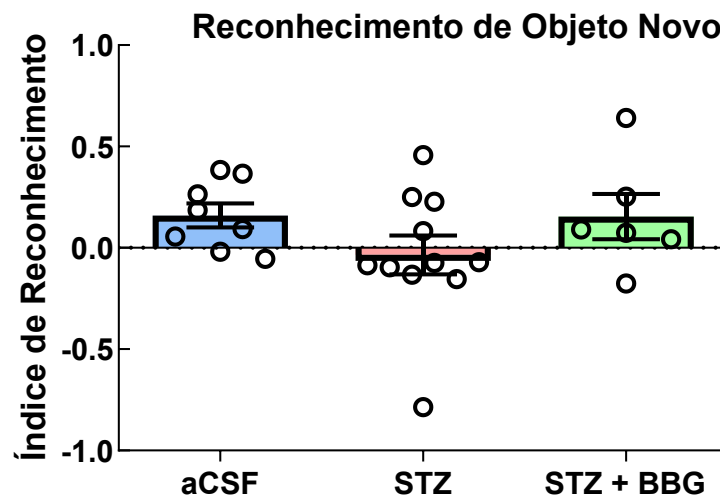


Figura 9. Índice de discriminação no teste de reconhecimento de objeto novo nos grupos aCSF, STZ e STZ + BBG. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com exclusão de outliers. A análise estatística foi realizada por Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas, e teste de Mann-Whitney entre aCSF e STZ. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

5.1.5 Teste do labirinto em Y

A avaliação da memória espacial de trabalho foi realizada por meio do índice de alternância espontânea (%) no Labirinto em Y. Os dados apresentaram distribuição normal em todos os grupos experimentais, conforme o teste de D'Agostino e Pearson ($p > 0,05$), permitindo a utilização de análise estatística paramétrica. A comparação entre os grupos foi realizada por meio de ANOVA de uma via, a qual não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p = 0,1611$).

Como análise complementar, visando confirmar a robustez dos resultados, os dados também foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que igualmente não indicou diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,161$). Apesar da variação observada nos valores médios, as comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey não identificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Assim, os dados não permitem afirmar efeito significativo do tratamento com BBG sobre a memória espacial de trabalho no modelo de STZ (Figura 10).

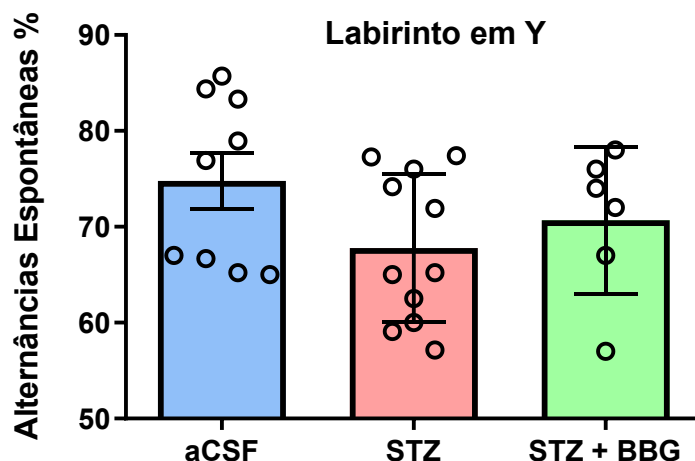


Figura 10. Porcentagem de alternância espontânea no Labirinto em Y, nos grupos aCSF, STZ e STZ + BBG. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com 6 a 11 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via e teste de Kruskal-Wallis, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

5.1.6 Teste de esquiva passiva

O teste de esquiva passiva foi empregado para investigar a memória aversiva de curta e de longa duração em camundongos submetidos ao modelo de neurodegeneração induzido por STZ, com ou sem tratamento com o antagonista purinérgico BBG. A latência de descida da plataforma foi registrada em dois momentos experimentais distintos, 15 minutos (memória de curto prazo) e 24 horas (memória de longo prazo) após o estímulo condicionado, caracterizando um delineamento com medidas repetidas no tempo.

Na fase de memória de curto prazo (15 minutos), observou-se comprometimento cognitivo associado à administração de STZ. A análise estatística foi conduzida por ANOVA de duas vias com medidas repetidas (modelo misto), considerando o fator grupo como variável inter-sujeitos e o fator tempo como variável intra-sujeitos. Os dados atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, permitindo a aplicação de testes paramétricos. A análise revelou efeito significativo do fator grupo ($F(2,24) = 3,501$; $p = 0,0463$), sem interação significativa com o tempo ($p = 0,6774$). As comparações múltiplas realizadas pelo teste de Dunnett, utilizando o grupo STZ como controle, demonstraram que os

animais do grupo STZ + BBG apresentaram latências significativamente maiores em relação ao grupo STZ ($p = 0,0439$), enquanto a comparação entre os grupos aCSF e STZ indicou uma tendência à diferença ($p = 0,0866$). Esses achados sugerem que o bloqueio do receptor P2X7 pelo BBG atenuou o déficit de memória aversiva de curta duração induzido pela STZ, promovendo a preservação dos mecanismos iniciais de consolidação do aprendizado aversivo.

Na fase de memória de longo prazo (24 horas), a mesma abordagem estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), indicando que o efeito deletério da STZ foi menos pronunciado nesse intervalo temporal e que o tratamento com BBG não promoveu melhora detectável na retenção tardia. O delineamento experimental foi restrito a três grupos (aCSF, STZ e STZ + BBG) com o objetivo de avaliar de forma direcionada o impacto do bloqueio do P2X7R sobre o déficit cognitivo induzido pela STZ, além de reduzir variabilidade experimental e atender aos princípios éticos de redução no uso de animais. Em conjunto, os resultados indicam que o efeito protetor do BBG se manifesta predominantemente sobre os estágios iniciais de consolidação da memória aversiva, sem impacto estatisticamente significativo sobre sua manutenção a longo prazo (Figura 11).

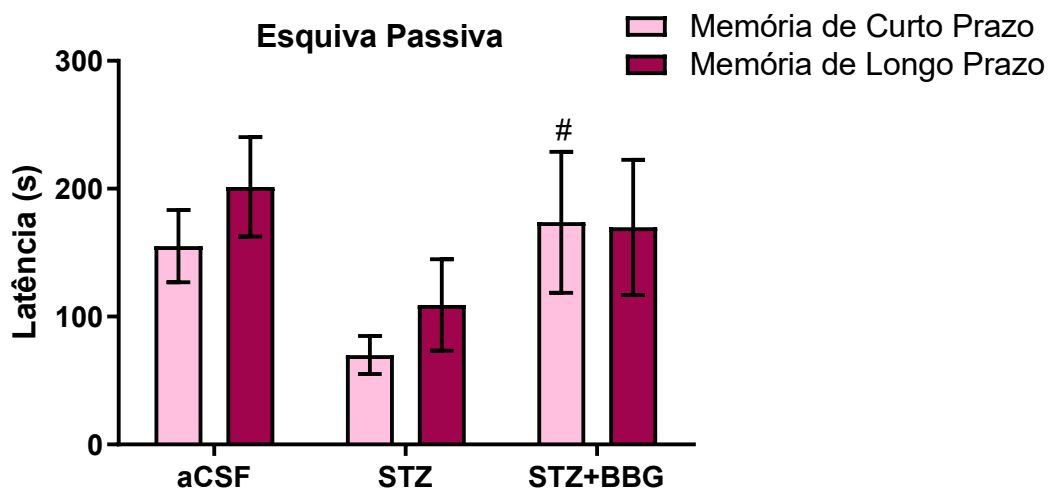


Figura 11. Latência de descida (em segundos) no teste de esquiva passiva nos grupos aCSF, STZ e STZ + BBG, avaliada nos testes de memória de curto prazo (15 min) e memória de longo prazo (24 h). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas (modelo misto), considerando o grupo experimental como fator entre sujeitos e o tempo (15 min e 24 h) como fator intra-sujeitos, seguida do teste *post hoc* de Dunnett, utilizando o grupo STZ como controle, quando identificado efeito significativo do fator grupo. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo STZ.

Os principais resultados obtidos nos testes comportamentais estão organizados em formato resumido na tabela abaixo (Tabela 3). A apresentação inclui as comparações estatisticamente relevantes entre os grupos experimentais, os respectivos valores de significância e os efeitos observados. Esse sumário permite visualizar de forma integrada os impactos da STZ e do tratamento com BBG sobre os diferentes domínios comportamentais avaliados.

Tabela 3. Sumário dos Efeitos Comportamentais de STZ vs. BBG sobre os diferentes testes comportamentais.

Teste Comportamental	Variável Analisada	Resultado Estatístico	Resultado
Atividade Locomotora	Distância Total Percorrida (m)	Sem diferença entre grupos ($p > 0.05$)	STZ e BBG não alteraram a atividade locomotora espontânea
	<i>Número de Rearings</i>	STZ+BBG vs. STZ ($p = 0.058$)	Tendência de aumento de <i>rearing</i> s com BBG
Nado Forçado	Tempo de Imobilidade	STZ vs. aCSF ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. STZ ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. STZ ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. aCSF ($p = 0.0188$)	BBG protegeu contra o efeito depressivo do STZ
LCE	Tempo nos Braços Abertos (s)	STZ vs. aCSF ($p = 0.0142$); STZ+BBG vs. STZ ($p = 0.0004$); STZ+BBG vs. aCSF+BBG ($p = 0.0073$); STZ+BBG vs. aCSF ($p = 0.3382$)	BBG aumentou o tempo nos braços abertos em animais previamente tratados com STZ
	Entradas nos Braços Abertos (%)	STZ vs. STZ+BBG ($p = 0.0041$)	BBG aumentou a proporção de entradas nos braços abertos em animais previamente tratados com STZ.
	Total de Entradas nos Braços Fechados	Sem diferença entre grupos ($p > 0.05$)	BBG e STZ não alteraram a atividade locomotora no LCE.

RON	Índice de Discriminação	STZ vs. aCSF (p = 0.0620)	Tendência à redução do índice de reconhecimento
Labirinto em Y	Índice de Alternância (%)	Sem diferença entre grupos (p = 0.1611)	BBG não influenciou sobre a memória espacial de trabalho no modelo STZ
Esquiva Passiva	Latência de Descida (s) Recente	STZ vs. aCSF (p = 0.0866); STZ+BBG vs. STZ (p = 0.0439)	BBG protegeu contra o prejuízo de memória recente induzido por STZ
	Latência de Descida (s) Tardia	Sem diferença entre grupos (p > 0.05)	Déficit de memória tardia induzido por STZ menos evidente.

5.2 Resultados Bioquímicos

5.2.1 Glicose sanguínea

A dosagem da glicose sanguínea foi realizada nos dias 0 (D0) e 19 (D19) do protocolo experimental, com o objetivo de verificar se a administração i.c.v de STZ induziria alterações compatíveis com um fenótipo diabético. As análises foram conduzidas nos grupos aCSF e STZ, utilizando-se amostras obtidas por punção caudal e leitura em glicosímetro portátil.

A análise estatística foi conduzida por ANOVA de duas vias (fatores: tratamento e tempo), seguida do teste *post hoc* de Tukey. Não foram observados efeitos significativos do tratamento ($F(1,36) = 0,00044$; $p = 0,9834$), do tempo ($F(1,36) = 0,0440$; $p = 0,8350$) ou da interação entre ambos os fatores ($F(1,36) = 0,6866$; $p = 0,4128$).

As comparações múltiplas pelo teste de Tukey confirmaram a ausência de diferenças significativas entre as combinações avaliadas (todas $p > 0,05$). Em particular, os níveis médios de glicose mantiveram-se estáveis entre os grupos aCSF e STZ tanto no D0 ($146,1 \pm 13,5$ vs. $136,2 \pm 13,5$ mg/dL; $p = 0,8827$) quanto no D19 ($138,4 \pm 13,5$ vs. $144,3 \pm 13,5$ mg/dL; $p = 0,9716$).

Esses resultados indicam que o modelo experimental utilizado não promoveu alterações significativas na glicemia basal ou final, descartando o desenvolvimento de

um estado hiperglicêmico sustentado após a administração central de STZ (Figura 12).

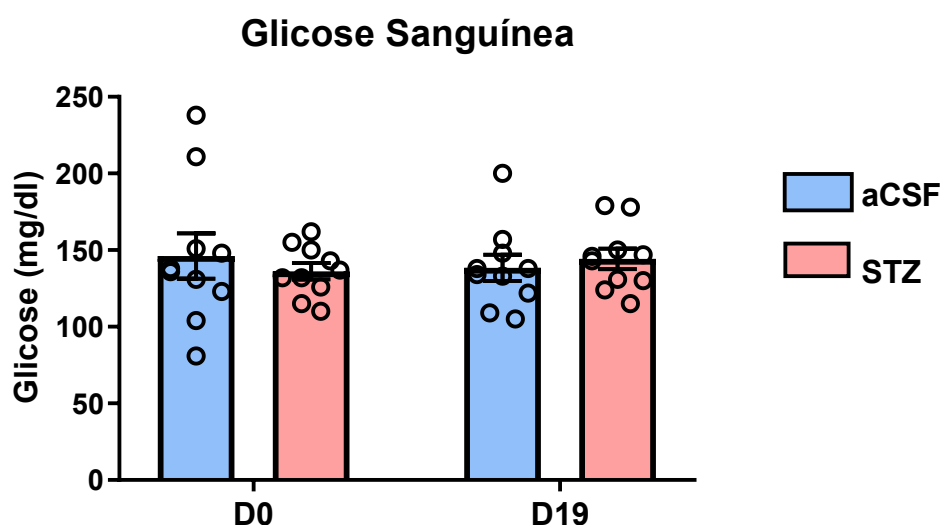


Figura 12. Níveis de glicose sanguínea (mg/dL) nos grupos aCSF e STZ, avaliados antes (D0) e após (D19) a administração i.c.v de estreptozotocina (STZ). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 10$ por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste *post hoc* de Tukey. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, nem interações entre os fatores avaliados ($p > 0,05$).

5.2.2 Peroxidação Lipídica

Com o objetivo de investigar o impacto do modelo de neurodegeneração induzido por STZ sobre o estresse oxidativo, e o potencial efeito antioxidante do tratamento com BBG, foi realizada a quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), nas regiões do córtex pré-frontal (CPF) e do hipocampo, e expressas em milimolares de malondialdeído (MDA), um marcador clássico de dano oxidativo à membrana celular.

No hipocampo, os animais do grupo STZ apresentaram um aumento significativo nos níveis de MDA em comparação ao grupo aCSF, conforme demonstrado pela ANOVA de uma via ($F(2,24) = 5,952$; $p = 0,0080$) e pelo teste *post hoc* de Tukey ($p = 0,0223$), evidenciando um quadro de acentuada peroxidação lipídica em resposta à neurotoxicidade induzida. O tratamento com BBG reduziu de forma consistente os níveis de TBARS, que se aproximaram dos valores observados no grupo controle. A comparação entre STZ e STZ + BBG revelou diferença

estatisticamente significativa ($p = 0,0160$), enquanto os valores entre aCSF e STZ + BBG permaneceram semelhantes ($p = 0,9119$), indicando um efeito antioxidante robusto e restaurador do BBG (Figura 13A).

A quantificação dos níveis de MDA na região do CPF não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. A ANOVA de uma via não identificou efeito global do tratamento ($F(2,23) = 1,864$; $p = 0,1778$), indicando que as variações observadas não foram suficientes para caracterizar um aumento consistente da peroxidação lipídica no CPF após a administração de STZ.

Ainda assim, observou-se que os animais do grupo STZ apresentaram valores médios mais elevados em relação ao grupo aCSF, e que o tratamento com BBG promoveu uma discreta tendência à redução desses níveis no grupo STZ + BBG, embora esta diferença não tenha alcançado significância estatística ($p = 0,1536$). Os valores do grupo tratado concentraram-se mais próximos aos observados no grupo controle, sugerindo uma possível atenuação parcial do estresse oxidativo, ainda que sem suporte estatístico formal (Figura 13B).

De forma integrada, os dados obtidos nas duas regiões sugerem que a administração de STZ desencadeia um aumento do estresse oxidativo cerebral, mais pronunciado no hipocampo, e que o BBG foi capaz de atenuar esse processo de maneira consistente. Mesmo diante da ausência de significância formal em algumas comparações, o conjunto dos achados, estatísticos e visuais, aponta para um efeito neuroprotetor do BBG contra os danos oxidativos induzidos pela STZ.

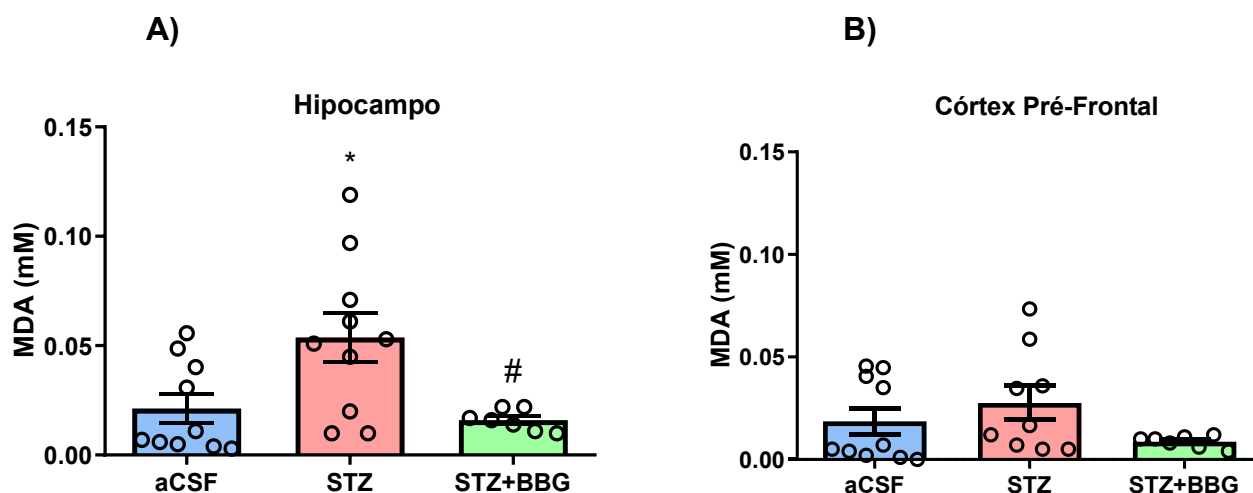


Figura 13. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressa em mM de malondialdeído (MDA), nos grupos aCSF, STZ e STZ + BBG. A) Hipocampo; B) Córtex pré-frontal. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 7$ a 10 por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo aCSF; # $p < 0,05$ em relação ao grupo STZ.

5.2.3 Quantificação de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3)

A análise do conteúdo de nitrito/nitrato, como indicativo da produção de óxido nítrico e estresse nitrosativo, foi realizada nas regiões do CPF e do hipocampo de animais submetidos à administração ICV-STZ com ou sem tratamento com BBG.

No hipocampo, os animais do grupo STZ apresentaram aumento significativo nos níveis de nitrito em comparação ao grupo aCSF, conforme demonstrado pelo teste de Kruskal-Wallis ($H = 10,91$; $p = 0,0043$) e pelo pós-teste de Dunn ($p = 0,0064$), sugerindo ativação de vias pró-inflamatórias e acúmulo de espécies reativas de nitrogênio em resposta à lesão neurotóxica. Apesar do tratamento com BBG ter promovido valores medianos numericamente inferiores aos observados no grupo STZ, a diferença entre os grupos STZ e STZ + BBG não atingiu significância estatística ($p > 0,9999$). Adicionalmente, os níveis de nitrito no grupo STZ + BBG permaneceram significativamente elevados em relação ao grupo aCSF ($p = 0,0457$), indicando que o BBG não foi capaz de reverter o estresse nitrosativo hipocampal induzido pela STZ (Figura 14A).

No CPF, embora o gráfico apresente certa variabilidade entre os grupos, nenhuma das comparações atingiu significância estatística. A análise global pelo teste de Kruskal-Wallis não identificou diferenças relevantes entre as condições experimentais ($H = 3,656$; $p = 0,1607$). De forma consistente, o pós-teste de Dunn confirmou a ausência de diferenças entre os grupos aCSF e STZ ($p > 0,9999$), bem como entre aCSF e STZ + BBG ($p = 0,2766$). Os valores do grupo STZ + BBG, embora numericamente superiores aos do grupo STZ, também não diferiram de forma significativa ($p = 0,2417$). Esses resultados indicam que, ao contrário do observado no hipocampo, o modelo com STZ não produziu aumento detectável nos níveis de nitrito no CPF, e que o BBG tampouco exerceu efeito modulador claro sobre esse marcador (Figura 14B).

Em conjunto, os dados reforçam o impacto do modelo com STZ sobre o aumento do estresse nitrosativo, especialmente no hipocampo, onde o efeito foi estatisticamente robusto. Embora o BBG tenha promovido uma atenuação visual e estatística parcial desses efeitos, o grau de reversão observado não foi suficiente para restaurar totalmente os níveis aos valores basais.

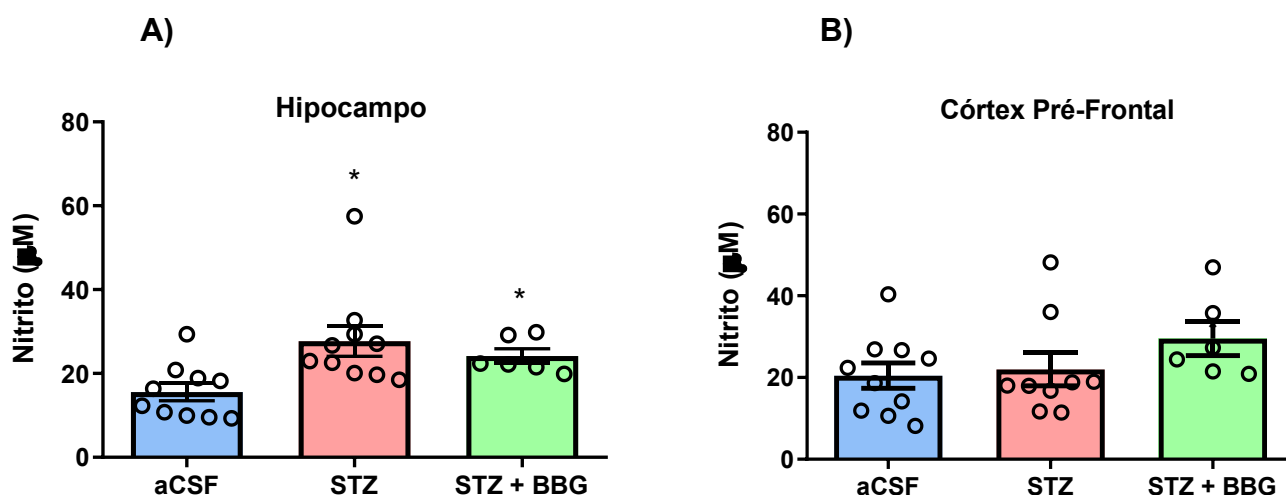


Figura 14. Concentração de nitrito (μM) nos grupos aCSF, STZ e STZ + BBG. A) Hipocampo. B) Córtex pré-frontal. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n = 6$ a 10 por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo aCSF.

Os dados bioquímicos obtidos nas diferentes regiões encefálicas e nos diferentes tempos experimentais fornecem evidências complementares aos achados comportamentais. A Tabela 4 apresenta um resumo das principais comparações entre os grupos experimentais para os marcadores de glicemia, estresse oxidativo e nitrosativo, destacando os efeitos induzidos pela administração de STZ e os potenciais efeitos moduladores do BBG.

Tabela 4. Sumário dos Efeitos Bioquímicos da STZ e do BBG sobre marcadores de estresse oxidativo, nitrosativo e metabólico.

Parâmetro Bioquímico	Variável Analisada	Resultado Estatístico	Resultado
Glicemia (mg/dL)	D0 vs. D19	aCSF vs. STZ (D0: $p = 0.9772$; D19: $p = 0.9986$); D0 vs. D19 (intra grupo: $p > 0.99$)	STZ não induziu hiperglicemia; modelo não gerou fenótipo diabético

TBARS (Hipocampo)	Concentrações de MDA (nmol/mg)	STZ vs. aCSF (p = 0.0223); STZ vs. STZ+BBG (p = 0.0160)	STZ aumentou peroxidação lipídica; BBG reduziu de forma significativa, restaurando níveis próximos ao controle.
TBARS (Prefrontal Cortex)	Concentrações de MDA (nmol/mg)	STZ vs. aCSF (p > 0.05); STZ vs. STZ+BBG (p = 0.1536)	Tendência de redução com BBG, mas sem significância estatística.
Nitrito (Hipocampo)	Concentração de nitrito (µM/mg de tecido)	STZ vs. aCSF (p = 0.0064); STZ vs. STZ+BBG (p > 0.9999)	STZ aumentou nitrito; BBG não reduziu nitrito e não diferiu do STZ.
Nitrito (Prefrontal Cortex)	Concentração de nitrito (µM/mg de tecido)	STZ vs. aCSF (p > 0.9999); STZ+BBG vs. STZ (p = 0.2417)	Sem diferenças significativas; BBG não modulou este marcador.

5.3 Resultados Imunohistoquímicos

5.3.1 Densidade de microglial na região CA1 do hipocampo

Para investigar a ativação microglial em diferentes condições experimentais, foi realizada a marcação imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo Iba-1 na região CA1 do hipocampo. As imagens foram obtidas por meio de microscopia de fluorescência utilizando objetiva de 20x, com cada campo visual correspondente a 100 micrômetros, conforme indicado nas micrografias representativas.

A análise quantitativa revelou um padrão distinto entre os grupos experimentais. No grupo aCSF, o número de micróglia permaneceu dentro dos limites basais, com média de 73,25 células positivas por campo. Esse perfil se manteve praticamente inalterado no grupo que recebeu BBG isoladamente (aCSF+BBG), cuja média foi de 79 células por campo, sem diferença estatística entre os dois grupos. De acordo com a ANOVA de duas vias, não houve efeito significativo do fator “campo” ($F(5,61) = 0,6985$; $p = 0,6266$) nem interação entre os fatores ($F(15,61) = 0,7956$; $p = 0,6775$), indicando que as variações entre campos não influenciaram o padrão geral de resposta. Esses achados sugerem que o bloqueio dos

receptores P2X7 pelo BBG, na ausência de um estímulo lesivo, não interfere na densidade microglial sob condições fisiológicas.

No entanto, esse cenário muda de forma marcante no grupo que recebeu STZ. Nesses animais, foi observado um aumento expressivo na densidade de micróglia, alcançando uma média de 175,8 células por campo. Esse valor representa mais do que o dobro do observado nos grupos controle e foi estatisticamente superior tanto em relação ao grupo aCSF quanto ao aCSF+BBG, conforme indicado pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,0001$ em todas as comparações correspondentes). A presença aumentada de células Iba-1 positivas nesse grupo evidencia uma resposta microglial exacerbada, compatível com um processo inflamatório desencadeado pela administração central de STZ.

Curiosamente, quando o BBG foi administrado em conjunto com a STZ (STZ+BBG), observou-se uma redução significativa no número de micróglia em comparação ao grupo STZ. A média caiu para 101,3 células por campo, e essa diminuição foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Embora esse valor ainda esteja numericamente acima dos níveis basais, as comparações com os grupos aCSF e aCSF+BBG não atingiram significância estatística, sugerindo uma tendência de reversão parcial da resposta inflamatória (Figura 15A).

As imagens ilustrativas capturadas sob as mesmas condições de exposição reforçam os dados quantitativos, permitindo visualizar de maneira clara o aumento da densidade microglial no grupo STZ e a atenuação desse efeito com a administração de BBG (Figura 15B).

Esses resultados indicam que o modelo induzido por STZ provoca uma ativação microglial significativa na região CA1 do hipocampo e que a intervenção farmacológica com BBG, por meio da inibição dos receptores P2X7, é capaz de modular essa resposta, reduzindo a densidade de micróglia para níveis próximos aos observados em condições fisiológicas.

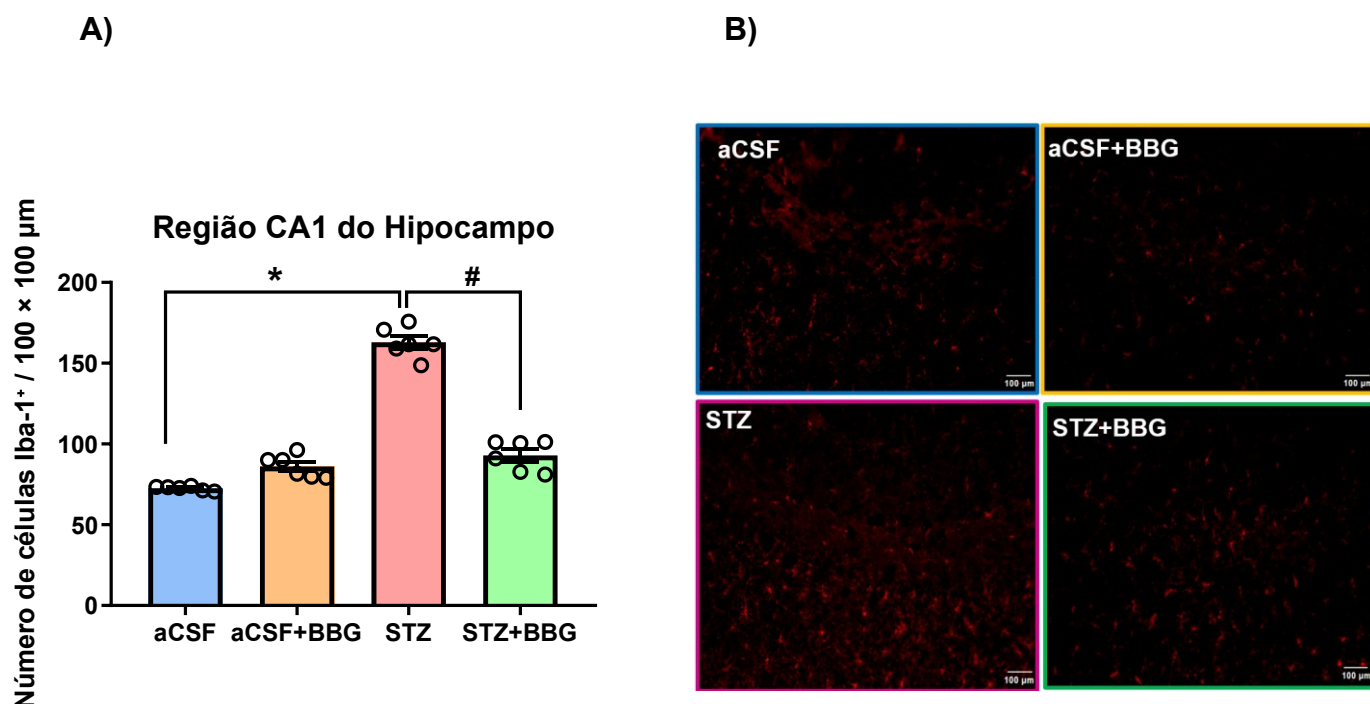


Figura 15. Quantificação de micróglia (células Iba-1⁺) na região CA1 do hipocampo. (A) Número de células Iba-1⁺ por área padronizada de 100 × 100 μm nos diferentes grupos experimentais. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM) ($n = 6-8$ animais por grupo; total de 28-32 campos analisados por grupo). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey, considerando $p < 0,05$. (B) Imagens representativas da imunomarcagem para Iba-1 (fluorescência vermelha) na região CA1 do hipocampo, obtidas por microscopia de fluorescência com objetiva de 20x. Cada campo corresponde a uma área de 100 × 100 μm. As imagens ilustram a densidade celular típica de cada grupo experimental. A quantificação foi realizada manualmente com auxílio do software *ImageJ*.

5.3.2 Reconstituição 3D de micróglia

Com o objetivo de investigar com mais profundidade as alterações estruturais da micróglia nos diferentes grupos experimentais, foram realizadas reconstruções tridimensionais das células imunorreativas a Iba-1 na região CA1 do hipocampo. As imagens foram obtidas por microscopia confocal com objetiva de 40x, utilizando-se a técnica de varredura em z (*z-stack*), a fim de capturar sucessivos planos focais ao longo da espessura da amostra. Essa abordagem possibilita a observação da célula em diferentes ângulos e profundidades, explorando sua estrutura completa em três dimensões (3D). A reconstrução e análise foram realizadas no software *Imaris*, e a escala de cada imagem corresponde a 10μm. A partir dessas reconstruções, foram

extraídos três parâmetros morfológicos principais: número de interseções (por análise de *Sholl*), comprimento total dos processos e número de processos por célula.

Por meio da quantificação do número de interseções foi possível mapear a complexidade da arborização microglial em função da distância radial em relação ao soma. No grupo STZ, observou-se um padrão morfológico nitidamente mais complexo, com um aumento acentuado no número de interseções entre 8 e 24 μm , atingindo um pico médio de 11,71 interseções a 16 μm . Comparado aos grupos controle (aCSF: 9,81 interseções; aCSF+BBG: 8,07 interseções), esse valor foi significativamente mais alto, como confirmado pela ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey ($p < 0,0001$ para ambas as comparações). Esse padrão indica uma clara hiper-ramificação dos prolongamentos da micróglia como parte da ativação induzida pela STZ (Figura 16A).

A intervenção com BBG, no grupo STZ+BBG, modificou esse perfil de maneira evidente. O número médio de interseções nesse grupo caiu para 9,88, representando uma redução significativa em relação ao grupo STZ ($p = 0,0004$). Embora os valores não tenham retornado totalmente ao padrão basal, o grupo STZ+BBG não diferiu estatisticamente dos grupos aCSF ou aCSF+BBG ($p > 0,7$), sugerindo uma tendência de reversão. Esse padrão mais simples e contido da arborização também se manteve ao longo das outras distâncias avaliadas, com diferenças significativas pontuais entre 8 e 20 μm .

Esse efeito de expansão morfológica também se refletiu no comprimento total dos processos da micróglia, que acompanhou de perto o perfil das interseções. No grupo STZ, os processos celulares atingiram uma média de $361,1 \pm 14,36 \mu\text{m}$, valor significativamente maior do que o observado no grupo aCSF ($243,5 \pm 13,92 \mu\text{m}$), diferença confirmada pela ANOVA de duas vias, com efeito significativo do fator tratamento e interação tratamento $\times$ BBG ($p < 0,001$). O pós-teste de Tukey revelou ainda que o grupo STZ diferiu de forma robusta tanto do grupo aCSF ($p = 0,0009$) quanto do grupo aCSF+BBG ($p = 0,0017$). Essa diferença representa um aumento de aproximadamente 48% na extensão dos prolongamentos, indicando que, além de mais complexa, a microglia ativada pela STZ é também mais expansiva (Figura 16B).

O tratamento com BBG, novamente, modulou esse efeito. O comprimento médio dos processos no grupo STZ+BBG foi reduzido para $280,0 \pm 14,05 \mu\text{m}$,

diferença que permanece altamente significativa em relação ao grupo STZ, conforme indicado pela ANOVA de duas vias ($p \leq 0,0001$ no pós-teste de Tukey). Ainda que numericamente superior aos grupos controle, o grupo STZ+BBG não diferiu estatisticamente do aCSF quando considerado o fator tratamento isolado, mas manteve-se distinto do padrão basal no pós-teste específico para este parâmetro. Complementando essa análise, o número de processos por célula também seguiu uma trajetória semelhante. A administração de STZ induziu um aumento substancial nesse parâmetro, com média de $28,46 \pm 0,96$ processos, significativamente maior do que nos grupos controle (aCSF: $18,82 \pm 1,15$; aCSF+BBG: $17,15 \pm 1,38$; $p < 0,0001$). O grupo STZ+BBG, por sua vez, apresentou uma redução significativa, com $23,74 \pm 0,97$ processos ($p < 0,0001$ vs. STZ), evidenciando uma proteção importante (Figura 16C).

Esses achados também se refletem nas imagens representativas das reconstruções tridimensionais. Nas amostras do grupo STZ, a micróglia aparece visivelmente densa, com ramificações longas e numerosas, que se expandem por toda a célula. Nos grupos controle, por outro lado, as células mantêm um perfil mais compacto e menos arborizado. Já o grupo STZ+BBG revela uma micróglia com arquitetura mais controlada, em que os prolongamentos são menos numerosos, menos longos e menos complexos, refletindo visualmente o que os dados quantitativos indicam com precisão (Figura 16D).

Em conjunto, os resultados demonstram que a ativação morfológica da micróglia induzida pela STZ pode ser significativamente atenuada pela ação do BBG, apontando para o papel regulador dos receptores P2X7 na morfologia microglial e, potencialmente, na resposta neuroinflamatória observada na região CA1 do hipocampo.

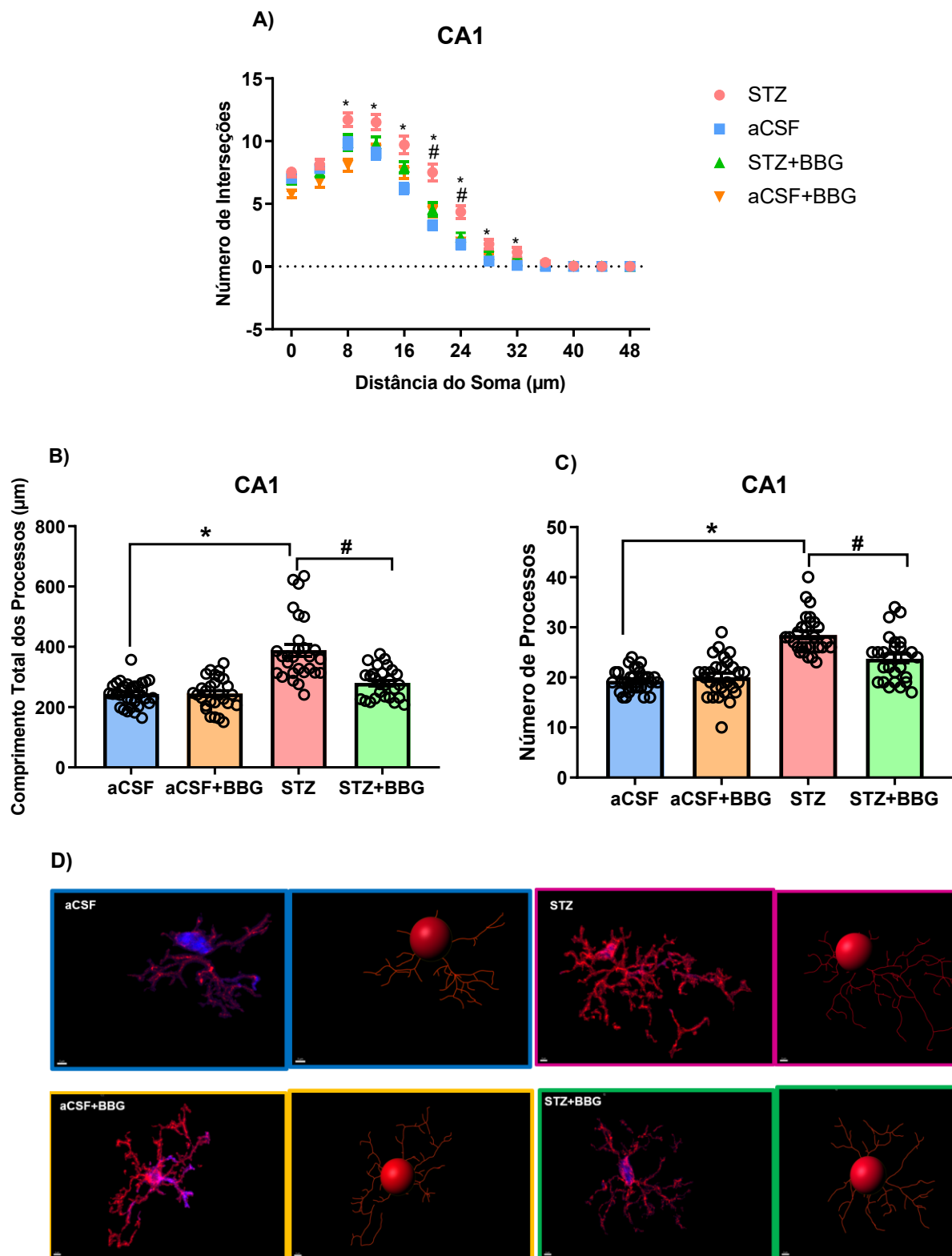


Figura 16. Análise morfológica da micróglia (Iba-1) na região CA1 do hipocampo. A) Número de interseções em função da distância radial ao soma nos grupos aCSF, aCSF+BBG, STZ e STZ+BBG. B) Comprimento total dos processos microgliais nos diferentes grupos experimentais. C) Número de processos por célula microglial. Os dados representam médias $\pm$ erro padrão da média. As análises quantitativas foram

realizadas por ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ para comparado ao grupo aCSF; # $p < 0,05$ comparado ao grupo STZ. D) Imagens representativas das reconstruções tridimensionais de células microgлияis nos diferentes grupos experimentais. As células de micróglia foram marcadas com Iba-1 (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas por microscopia confocal (objetiva de 40x). Reconstruções 3D realizadas no software Imaris; barra de escala: 10 μm .

5.3.3 Densidade de astrocitária na região CA1 do hipocampo

Para avaliar a resposta astrocitária nos diferentes grupos experimentais, foi realizada a marcação imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-GFAP na região CA1 do hipocampo. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência com objetiva de 20x, sendo cada campo visual equivalente a 100 micrômetros, conforme ilustrado nas micrografias representativas.

A análise quantitativa revelou variações evidentes no número de astrócitos entre os grupos experimentais. No grupo aCSF, o número médio de células GFAP-positivas por campo foi de 72,75, valor semelhante ao observado no grupo que recebeu apenas BBG (aCSF+BBG), com média de 66,5 células por campo. A comparação estatística entre esses dois grupos, realizada por ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey, não indicou diferença significativa ($p > 0,98$), sugerindo que o tratamento com BBG, isoladamente, não afetou a densidade astrocitária em condições fisiológicas.

Em contraste, os animais do grupo STZ apresentaram um aumento acentuado no número de astrócitos na região analisada, atingindo uma média de 176 células por campo. Esse valor foi significativamente superior aos observados nos grupos aCSF ($p < 0,0001$) e aCSF+BBG ($p < 0,0001$), indicando um aumento expressivo na reatividade astrocitária induzido pela administração ICV-STZ.

Já no grupo STZ tratado com BBG (STZ+BBG), foi observada uma redução marcante na densidade de astrócitos, com média de 41,5 células por campo. Essa diferença foi estatisticamente significativa em relação ao grupo STZ ($p < 0,0001$), demonstrando uma reversão do aumento previamente observado. Além disso, não houve diferença significativa entre o grupo STZ+BBG e os grupos controle (aCSF: $p = 0,23$; aCSF+BBG: $p = 0,59$), sugerindo que a quantidade de astrócitos nesses animais voltou a níveis semelhantes aos basais (Figura 17A).

As imagens obtidas nas mesmas condições de aquisição reforçam os achados quantitativos, evidenciando o aumento do número de células GFAP-positivas no grupo STZ e a normalização desse padrão nos animais tratados com BBG (Figura 17B).

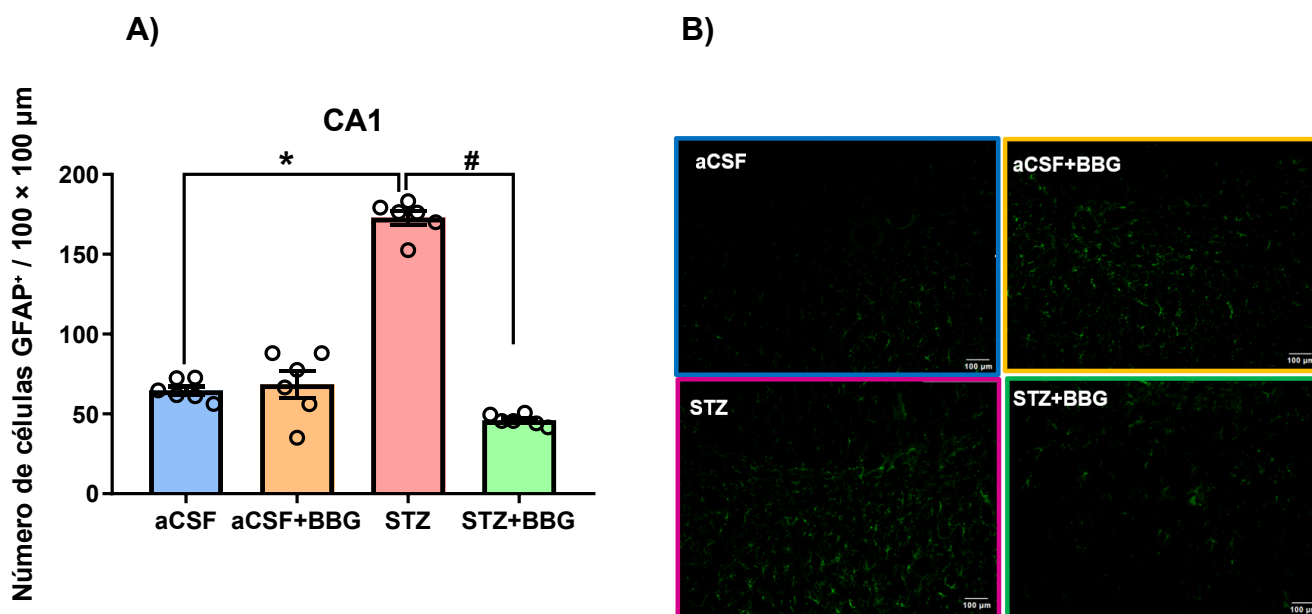


Figura 17. Quantificação de astrócitos (células GFAP⁺) na região CA1 do hipocampo. (A) Número de células GFAP⁺ por área padronizada de 100 × 100 μm nos diferentes grupos experimentais. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) ($n = 6-8$ animais por grupo; total de 28-32 campos analisados por grupo). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey, considerando $p < 0,05$. (B) Imagens representativas da imunomarcagem para GFAP (fluorescência verde) na região CA1 do hipocampo, obtidas por microscopia de fluorescência com objetiva de 20x. Cada imagem corresponde a uma área de 100 × 100 μm. A quantificação foi realizada manualmente com auxílio do software *ImageJ*.

5.3.4 Reconstituição 3D de astrócitos

Com o objetivo de investigar em maior profundidade as alterações morfológicas dos astrócitos nos diferentes grupos experimentais, foram realizadas reconstruções tridimensionais de células imunorreativas ao marcador GFAP na região CA1 do hipocampo. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal com objetiva de 40x, empregando a técnica de varredura em z (*z-stack*), que permite a captura sequencial de planos focais ao longo da espessura do tecido. Essa abordagem possibilita a visualização detalhada da célula em três dimensões, oferecendo uma representação fiel da arborização astrocitária. As reconstruções e

análises morfométricas foram conduzidas no software *ImageJ*, sendo a escala de cada imagem correspondente a 10 μm . A partir dessas reconstruções foram extraídos três parâmetros principais: número de interseções (análise de Sholl), comprimento total dos prolongamentos e número de processos por célula.

A análise de Sholl (número de interseções) permitiu mapear a complexidade da arborização astrocitária em função da distância radial em relação ao soma. No grupo STZ, observou-se um aumento significativo no número de interseções ao longo de praticamente todas as distâncias avaliadas, com pico entre 8 e 16 μm , indicando uma maior complexidade estrutural dos astrócitos. Comparado ao grupo aCSF, o número de interseções foi significativamente maior em todas as camadas radiais ($p = 0,0416$; ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey). Embora o grupo tratado com BBG após STZ (STZ+BBG) tenha apresentado uma redução nesse parâmetro, a diferença em relação ao grupo STZ não atingiu significância estatística. Por outro lado, o grupo aCSF+BBG exibiu um número de interseções significativamente superior ao grupo aCSF ($p < 0,0001$), sugerindo que o BBG, mesmo em condições fisiológicas, pode influenciar a estrutura morfológica dos astrócitos (Figura 18A).

Esse padrão também se refletiu no comprimento total dos prolongamentos, que apresentou diferenças expressivas mediadas pela interação entre os fatores analisados (ANOVA de duas vias: interação $F(1, 111) = 70,57$; $p < 0,0001$). Astrócitos dos grupos STZ e aCSF+BBG exibiram valores médios mais elevados em comparação ao grupo aCSF (diferenças de +115,7 μm e +102,1 μm , respectivamente; $p < 0,0001$), indicando um perfil mais expansivo de arborização glial. Já o grupo STZ+BBG apresentou uma redução significativa no comprimento total dos prolongamentos em comparação ao grupo STZ (diferença de -97,3 μm ; $p < 0,0001$), com valores semelhantes aos observados no grupo controle ($p = 0,6840$), o que sugere uma reversão parcial da expansão morfológica induzida pela STZ (Figura 18B).

O número de processos por célula seguiu uma trajetória semelhante. A exposição à STZ resultou em um aumento significativo nesse parâmetro em relação ao grupo aCSF, com média de 26,63 processos por célula versus 17,77 no grupo aCSF ($p < 0,0001$). O grupo aCSF+BBG também apresentou aumento significativo em relação ao controle (26,41 processos em média; $p < 0,0001$), reforçando a ideia

de que o BBG pode influenciar a morfologia astrocitária mesmo na ausência de dano. No grupo STZ+BBG, o número médio de processos foi reduzido para 20,86, com diferença significativa tanto em relação ao grupo STZ ($p < 0,0001$) quanto ao grupo aCSF+BBG ($p < 0,0001$). Embora ainda diferissem modestamente do aCSF ($p = 0,0443$), os valores se aproximaram substancialmente do padrão basal, indicando uma proteção frente à expansão morfológica induzida pela STZ (Figura 18C).

As imagens representativas das reconstruções tridimensionais corroboram os dados quantitativos. No grupo STZ, os astrócitos apresentam uma estrutura altamente ramificada, com processos mais longos e numerosos que se estendem de forma densa a partir do corpo celular. Esse padrão contrasta com o perfil mais compacto e menos arborizado observado nos grupos aCSF e STZ+BBG. Já no grupo aCSF+BBG, nota-se um aumento na extensão e ramificação dos processos mesmo na ausência de estímulo lesivo, reforçando os dados que apontam para uma ação direta do BBG sobre a morfologia astrocitária (Figura 18D).

Em conjunto, os resultados indicam que a administração de STZ induz alterações morfológicas marcantes nos astrócitos da região CA1, refletidas por um aumento na complexidade e na extensão dos prolongamentos. O tratamento com BBG foi capaz de reverter parcialmente esses efeitos, especialmente no que se refere ao comprimento total e ao número de processos, sugerindo um possível efeito modulador sobre a morfologia glial. Além disso, o fato de o BBG também induzir alterações em condições fisiológicas levanta a possibilidade de um papel ativo dessa via purinérgica na organização estrutural basal da glia.

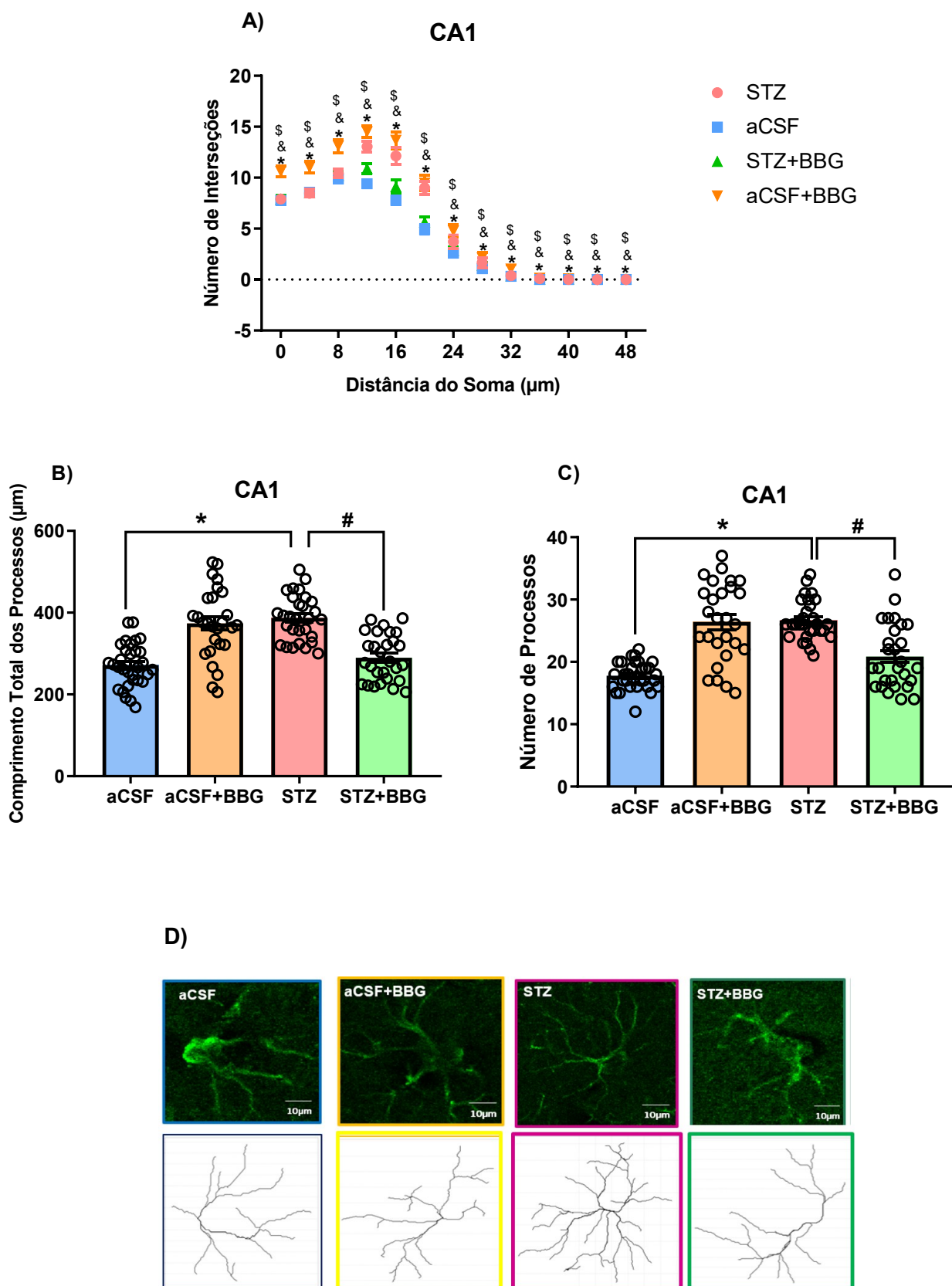


Figura 18. Análise morfológica de astrócitos (GFAP) na região CA1 do hipocampo. A) Número de interseções em função da distância radial ao soma nos diferentes grupos. Dados

representam médias $\pm$ erro padrão da média. B) Comprimento total dos prolongamentos astrocitários. C) Número de processos por célula astrocitária. As análises quantitativas foram realizadas por ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Tukey. Símbolos de significância: * $p < 0,05$ para STZ vs. aCSF; # $p < 0,05$ para STZ vs. STZ+BBG. D) Imagens representativas das reconstruções tridimensionais de astrócitos nos diferentes grupos experimentais. As células foram marcadas com GFAP (verde) e os núcleos com DAPI (azul). Todos os grupos apresentam $n = 6-8$ animais, com avaliação de 28 a 32 células por grupo. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal (objetiva 40x). As reconstruções 3D foram realizadas no software *ImageJ*, com barra de escala de 10 μm .

Os achados imunohistoquímicos demonstraram alterações significativas na ativação e morfologia de micróglias e astrócitos induzidas pela administração de STZ, bem como efeitos moduladores promovidos pelo tratamento com BBG. A Tabela 5 resume os principais parâmetros analisados na região CA1 do hipocampo, incluindo as variáveis morfológicas, as comparações estatísticas entre os grupos e as observações-chave para uma visualização integrada do impacto neuroinflamatório do modelo e da ação potencialmente neuroprotetora do BBG.

Tabela 5. Sumário dos efeitos da STZ e do BBG sobre a ativação e morfologia glial na região CA1 do hipocampo.

Análise Imunohistoquímica	Variável Analisada	Resultado Estatístico	Resultado
Densidade Microglial (Iba-1, CA1)	Nº de células positivas por campo	STZ vs. aCSF ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. STZ ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. aCSF ($p = 0.0683$)	STZ aumentou a densidade microglial; BBG reduziu significativamente
Morfologia Microglial – Interseções (Sholl)	Nº médio de interseções a 16 μm	STZ vs. aCSF ($p = 0.0009$); STZ+BBG vs. STZ ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. aCSF ($p = 0.4458$)	STZ induziu hiper-ramificação; BBG reverteu parcialmente, mas ainda foi $>$ aCSF.
Comprimento Total dos Processos (Microglia)	Comprimento médio (μm)	STZ vs. aCSF ($p < 0.0009$); STZ+BBG vs. STZ ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. aCSF ($p = 0.4458$)	STZ aumentou comprimento dos processos; BBG reduziu.
Nº de Processos por Célula (Microglia)	Nº médio de processos	STZ vs. aCSF ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. STZ ($p < 0.0001$); STZ+BBG vs. aCSF ($p = 0.0443$)	STZ aumentou processos; BBG reduziu fortemente, mas manteve discreta elevação sobre o basal.

Densidade Astrocitária (GFAP, CA1)	Nº de células GFAP+ por campo	STZ vs. aCSF (p < 0.0001); STZ+BBG vs. STZ (p < 0.0001); STZ+BBG vs. aCSF (p = 0.23)	STZ ↑ número de astrócitos; BGG normalizou
Morfologia Astrocitária – Interseções (Sholl)	Nº de interseções	STZ vs. aCSF (p = 0.0416); aCSF+BBG vs. aCSF (p < 0.0001)	BBG ↑ interseções mesmo sem lesão; STZ ↑ complexidade
Comprimento Total dos Processos (Astrócitos)	Comprimento médio (µm)	STZ vs. aCSF (p < 0.0001); STZ+BBG vs. STZ (p < 0.0001); STZ+BBG vs. aCSF (p = 0.6840)	STZ ↑ comprimento; BGG reverteu parcialmente
Nº de Processos por Célula (Astrócito)	Nº médio de processos	STZ vs. aCSF (p < 0.0001); STZ+BBG vs. STZ (p < 0.0001); aCSF+BBG vs. aCSF (p = 0.0443)	STZ e BGG ↑ processos; BGG modulou reversão parcial

5.4 Resultados da eletrofisiologia

Para explorar como a exposição aguda ao STZ poderia interferir na comunicação sináptica do hipocampo, foram conduzidos experimentos eletrofisiológicos em fatias de camundongos C57BL/6. Para isso, três abordagens complementares foram aplicadas em sequência: a indução de LTP por estimulação de alta frequência (HFS), a construção da curva de recrutamento sináptico (input/output, I/O) e, por fim, a observação direta da resposta sináptica à aplicação aguda do STZ durante o registro da linha de base. Todos os registros foram realizados na região CA1 do hipocampo, com estímulo das colaterais de Schaffer e monitoramento dos fEPSPs na camada *radiatum*.

A primeira etapa da análise concentrou-se na capacidade do tecido hipocampal de expressar LTP após o protocolo de HFS. Curiosamente, tanto o grupo controle (aCSF) quanto o grupo exposto ao STZ (30 µM) responderam ao estímulo de forma semelhante: uma elevação nítida e sustentada na inclinação do fEPSP, indicando que os mecanismos de plasticidade de longa duração permaneceram

funcionalmente intactos. A estatística reforçou essa impressão, sendo a comparação entre os grupos realizada por meio do teste de Mann-Whitney, devido à ausência de normalidade na distribuição dos dados, e não revelou diferença significativa ($U = 68$; $p = 0,9314$), com medianas praticamente equivalentes (46,44% para o aCSF e 48,32% para o STZ). Esse resultado inicial já apontava para um cenário no qual o STZ, ao menos sob exposição aguda, não impedia o processo de potencialização sináptica (Figura 19A).

Na etapa seguinte, buscou-se entender se o STZ afetaria de forma mais sutil a excitabilidade basal. Para isso, foi construída a curva I/O a partir de estímulos elétricos de intensidades crescentes. Como esperado, a resposta sináptica aumentou progressivamente com a intensidade do estímulo, refletindo o recrutamento gradual das vias sinápticas. A análise foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, com correção de Geisser-Greenhouse, e confirmou o efeito significativo da intensidade do estímulo ($F(1.928, 42.42) = 19,11$; $p < 0,0001$). Ainda assim, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($F(1, 22) = 3,405$; $p = 0,0785$), nem houve interação entre grupo e intensidade ($F(7, 154) = 0,3815$; $p = 0,9121$). Visualmente, o grupo STZ sugeria uma leve atenuação nas respostas, mas estatisticamente essa tendência não se confirmou (Figura 19B).

No entanto, o experimento final revelou resultados relevantes. Com a linha de base já estabilizada, o STZ foi introduzido diretamente no sistema de perfusão. O efeito foi imediato: a inclinação do fEPSP saltou, atingindo 103,8% acima do valor de referência. A análise por ANOVA de duas vias apontou para diferença altamente significativa ($F(19, 342) = 108,6$; $p < 0,0001$), com aumento significativo após a aplicação do STZ ($p < 0,0001$). Esse pico inesperado levantou a hipótese de uma ação aguda sobre a excitabilidade sináptica. No entanto, em menos de 35 minutos, os valores retornaram gradualmente aos níveis basais. Essa oscilação breve, embora expressiva, não corresponde a uma LTP genuína, pois carece de sustentação no tempo. Em vez disso, parece refletir um efeito transitório, possivelmente relacionado a alterações pontuais na homeostase celular ou no ambiente extracelular, sem o engajamento de mecanismos plásticos duradouros (Figura 19C).

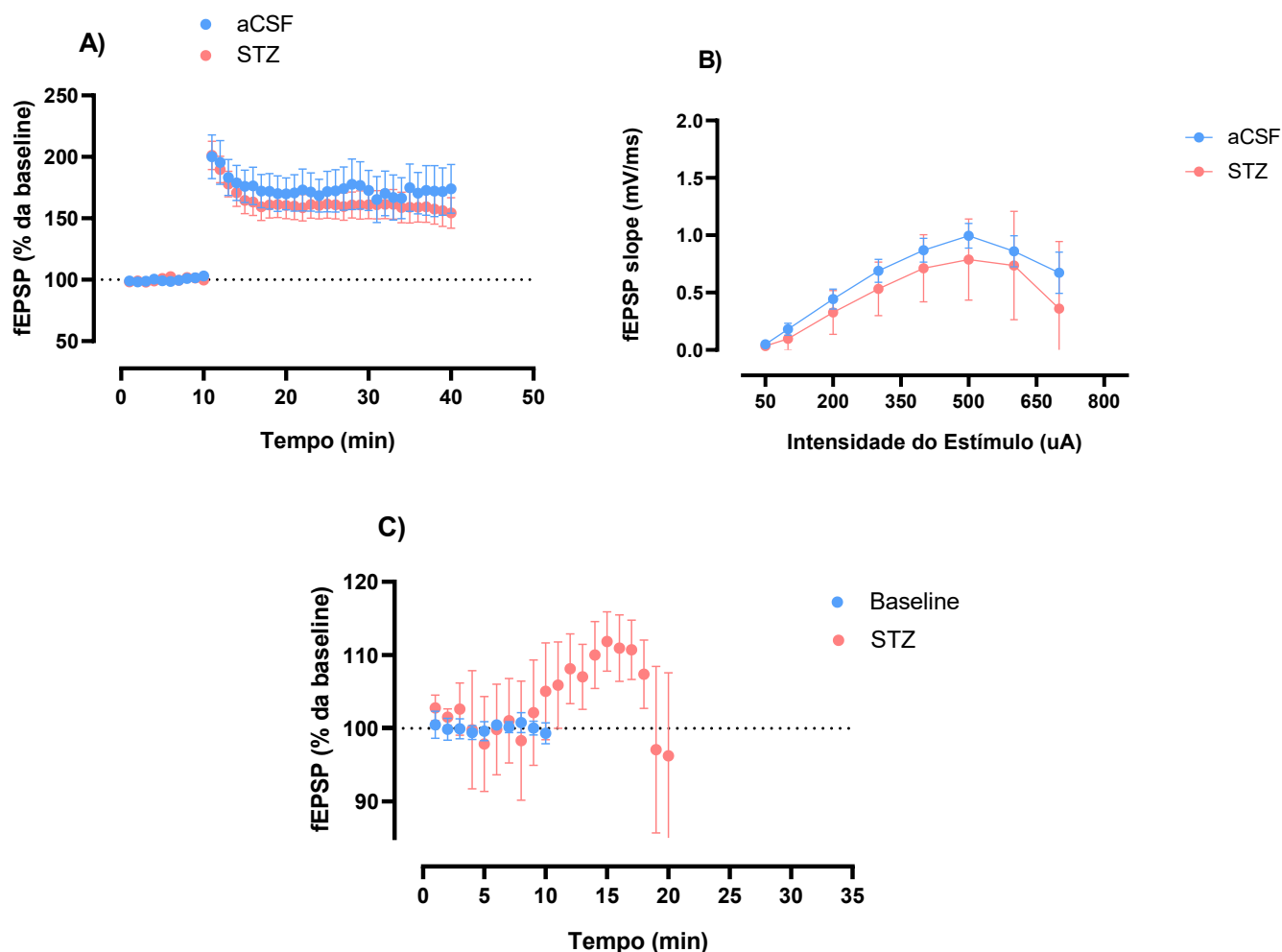


Figura 19. Avaliação eletrofisiológica da plasticidade e excitabilidade sináptica em fatias hipocâmpais *ex vivo*. A) Indução de LTP por estimulação de alta frequência (HFS) nos grupos aCSF e STZ (30 μ M). A inclinação do fEPSP foi normalizada em relação à linha de base. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A comparação entre os grupos foi realizada por teste de Mann-Whitney. B) Curva de recrutamento sináptico (input/output) obtida por estímulos de intensidades crescentes (50 a 700 μ A). Dados foram analisados por ANOVA de duas vias com correção de Geisser-Greenhouse. C) Efeito da aplicação aguda de STZ (30 μ M) sobre a linha de base sináptica. Análise realizada por ANOVA de duas vias, com fatores tempo e tratamento, seguida de pós-teste de comparações múltiplas. * $p < 0,0001$ para diferença entre antes e após a aplicação do STZ. $n = 9 - 12$ animais, com 30 fatias por grupo analisadas.

A Tabela 6 resume os principais achados eletrofisiológicos obtidos nos experimentos com fatias hipocâmpais. Os dados abordam a expressão da LTP, a excitabilidade basal e os efeitos agudos do STZ sobre a transmissão sináptica. A comparação entre os grupos permitiu avaliar o impacto funcional do composto sobre diferentes aspectos da plasticidade sináptica no CA1.

Tabela 6. Sumário dos feitos da STZ sobre parâmetros eletrofisiológicos da transmissão sináptica hipocampal.

Parâmetro Bioquímico	Variável Analisada	Resultado Estatístico	Resultado
Potenciação de Longo Prazo (LTP)	Inclinação do fEPSP após HFS	aCSF vs. STZ (p = 0.9314)	STZ não alterou a expressão da LTP; plasticidade sináptica preservada
Curva Input/Output (I/O)	Resposta sináptica vs. Intensidade do estímulo	Efeito da intensidade (p < 0.0001); Grupo STZ vs. aCSF (p = 0.0785); interação	Excitabilidade aumentou com o estímulo; STZ não afetou significativamente a curva
Resposta Sináptica à aplicação Aguda de STZ	Inclinação do fEPSP ao longo do tempo	Pré vs. Pós-STZ (p < 0.0001); pico + 103,8%	STZ causou aumento transitório da excitabilidade; efeito reversível e não sustentado

6 DISCUSSÃO

Diante da complexidade dos processos que sustentam as alterações cognitivas, emocionais e inflamatórias observadas na DA esporádica, torna-se relevante integrar evidências comportamentais e neurobiológicas para compreender como diferentes vias podem contribuir para a disfunção cerebral progressiva. No presente trabalho, a administração de STZ por via intracerebroventricular foi associada a alterações comportamentais e cognitivas, caracterizadas por prejuízos em tarefas de memória, aumento de comportamentos do tipo ansioso e depressivo, bem como por modificações compatíveis com respostas neuroinflamatórias no hipocampo. A intervenção farmacológica com BBG, antagonista do receptor P2X7, esteve associada à atenuação dessas alterações em diferentes desfechos comportamentais, incluindo a melhora do desempenho em testes de memória e a normalização de parâmetros relacionados à ansiedade, sem interferência na atividade locomotora basal. Adicionalmente, a modulação do receptor P2X7 foi acompanhada por alterações nos marcadores gliais avaliados, sugerindo uma possível relação entre a sinalização purinérgica, a resposta neuroinflamatória e os déficits funcionais induzidos pela STZ. Esses achados delinearam um cenário experimental que permite discutir, à luz da literatura, o papel do receptor P2X7 como um possível elo entre neuroinflamação e disfunções comportamentais em modelos de DA.

A avaliação da atividade locomotora representa uma etapa fundamental em estudos comportamentais com roedores, sobretudo quando o objetivo central é investigar funções cognitivas e emocionais. Alterações nesse parâmetro podem comprometer a interpretação de resultados posteriores, uma vez que déficits de memória ou comportamento emocional podem ser mascarados por alterações motoras inespecíficas (Cieślak e Wojtczak, 2018; Illes *et al.* 2020).

No presente estudo, os dados obtidos no teste do campo aberto demonstraram que a administração i.c.v de STZ, bem como o tratamento com BBG, não promoveram alterações significativas na atividade locomotora espontânea, evidenciada pela ausência de diferenças estatisticamente significativas no número de *crossings* entre os grupos experimentais (Figura 6). Esse achado também demonstra que o BBG não produz qualquer padrão de hiperlocomção ou estimulação motora,

reforçando que seu perfil comportamental não interfere de maneira inespecífica nos parâmetros locomotores básicos.

Este resultado é particularmente relevante, pois confirma a integridade motora geral dos animais, reforçando que os déficits comportamentais observados nos testes de memória e nos paradigmas emocionais, descritos posteriormente, não são atribuíveis a alterações na capacidade de locomoção. Modelos de neurodegeneração frequentemente cursam com alterações motoras secundárias, o que torna esse controle metodológico imprescindível (Farooq *et al.* 2018).

Adicionalmente, a análise do comportamento exploratório vertical (*rearings*) revelou uma tendência estatística de aumento no número de *rearings* no grupo STZ + BBG em comparação ao grupo STZ isolado ($p = 0,058$). Embora essa diferença não tenha atingido significância estatística convencional, ela sugere uma possível modulação do comportamento exploratório promovida pelo BBG, possivelmente refletindo um aumento na responsividade ambiental ou no estado de vigília. Um trabalho prévio de Savio e Coutinho-Silva (2019) corroborou esse achado, demonstrando que o bloqueio do receptor purinérgico P2X7 pode modular a motivação exploratória e a atenção a estímulos ambientais, especialmente em modelos caracterizados por neuroinflamação crônica.

Do ponto de vista neurobiológico, o P2X7R é reconhecido como um modulador importante da excitabilidade neuronal e da liberação de neurotransmissores, além de ser um mediador central da resposta inflamatória glial (Illes *et al.* 2020). Em 2018, Farooq e colaboradores indicaram que o bloqueio farmacológico desse receptor pode atenuar comportamentos relacionados à apatia, à diminuição de interesse por estímulos externos e à anedonia em modelos experimentais, reforçando a plausibilidade da tendência observada.

Em relação às respostas de emocionalidade, os resultados obtidos no teste do nado forçado indicam que a administração central de STZ esteve associada a alterações no comportamento emocional dos animais. O aumento significativo no tempo de imobilidade observado no grupo STZ, quando comparado aos grupos controle (aCSF e aCSF + BBG), é compatível com um comportamento do tipo depressivo, frequentemente interpretado como redução da capacidade de resposta

adaptativa frente a um ambiente aversivo, característica associada a estados de desesperança comportamental em roedores (Slattery e Cryan, 2012) (Figura 7).

Esse achado é consistente com a literatura que descreve o modelo i.c.v de STZ como uma ferramenta válida para a investigação de alterações comportamentais emocionais relacionadas à neurodegeneração, sendo o estresse oxidativo, o desequilíbrio metabólico e a neuroinflamação crônica alguns dos principais mecanismos subjacentes (Ribeiro *et al.* 2019; Andrejew *et al.* 2020). Estudos prévios já demonstraram que a neuroinflamação sustentada, especialmente mediada por ativação de micróglia e aumento de citocinas pró-inflamatórias, pode favorecer o surgimento de comportamentos depressivos em diferentes modelos experimentais de neurodegeneração (Yin *et al.* 2021).

Além disso, evidências clínicas e pré-clínicas indicam que os transtornos depressivos e a DA compartilham vias fisiopatológicas convergentes, envolvendo neuroinflamação crônica, disfunções no metabolismo energético cerebral e prejuízos nos mecanismos de plasticidade sináptica, sugerindo um substrato biológico comum entre alterações emocionais e cognitivas (Linnemann e Lang, 2020). De forma consistente com esse paradigma, estudos longitudinais demonstram que sintomas depressivos podem anteceder o declínio cognitivo e aumentar o risco para o desenvolvimento da DA, atuando como marcador prodromático ou fator de vulnerabilidade, e não apenas como consequência tardia da neurodegeneração (Saggu *et al.* 2024). Nesse contexto, os comportamentos do tipo depressivo observados no modelo ICV-STZ podem ser interpretados como a expressão de um estado neurobiológico integrado, no qual alterações metabólicas e inflamatórias cerebrais interagem de maneira sinérgica, contribuindo simultaneamente para disfunções emocionais e cognitivas (Raza *et al.* 2025).

O dado mais marcante, entretanto, foi o efeito do BBG, que evitou a instalação do comportamento tipo-depressivo desencadeado pela STZ. Animais do grupo STZ + BBG apresentaram redução robusta no tempo de imobilidade, com valores não apenas próximos aos observados no grupo controle, mas inferiores aos de ambos os grupos não lesionados, conforme evidenciado pelos contrastes *pós-hoc*. Esse achado sugere um efeito antidepressivo claro mediado pelo bloqueio da sinalização

purinérgica inflamatória, reforçando a influência do P2X7R na modulação do comportamento emocional.

O receptor P2X7, altamente expresso em micróglia, é reconhecido como um mediador-chave na liberação de citocinas pró-inflamatórias e na amplificação de respostas neuroimunes (Savio e Coutinho-Silva, 2019; Illes *et al.* 2020). Sua ativação sustentada tem sido amplamente associada a estados comportamentais depressivos em diversos modelos experimentais, incluindo o estresse crônico imprevisível e lesões neuroinflamatórias (Bhattacharya e Biber, 2016; Farooq *et al.* 2018). Assim, a interação entre STZ e BBG observada na ANOVA de duas vias reforça que o efeito comportamental do BBG é dependente da condição inflamatória instaurada pelo modelo, e não um efeito isolado do fármaco.

O presente achado reforça a hipótese de que o fenótipo depressivo observado no modelo STZ está ligado a mecanismos inflamatórios mediados por P2X7R, e que a intervenção farmacológica por meio do BBG é capaz de modular essa resposta, possivelmente por reduzir o estado de ativação microglial crônica, como já descrito por Andrejew e colaboradores (2020). A magnitude da reversão comportamental observada no grupo STZ + BBG (diferença média de 89,74 segundos em relação ao STZ) reforça a robustez dessa interpretação.

Por fim, o fato de que o BBG, administrado isoladamente (aCSF + BBG), não alterou o tempo de imobilidade dos animais reforça que o efeito observado não se trata de um efeito antidepressivo direto ou inespecífico, mas sim de uma modulação da resposta neuroinflamatória instaurada pelo STZ.

Adicionalmente, a exposição dos animais ao LCE revelou que a administração i.c.v. de STZ foi capaz de induzir um estado comportamental compatível com ansiedade, refletido pela redução significativa do tempo de permanência nos braços abertos em relação ao grupo controle (Figura 8C). Esse padrão é classicamente associado a uma maior aversão a ambientes abertos e elevados (Pellow *et al.* 1985; Walf e Frye, 2007) e está alinhado com evidências de que o STZ desencadeia um ambiente neuroquímico desfavorável, marcado pela ativação microglial e pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, os quais afetam diretamente circuitos envolvidos na regulação emocional (Yin *et al.* 2021; Ferreira *et al.* 2022; Sadeghi *et al.* 2023).

Nesse contexto, os resultados sugerem que o tratamento com BBG esteve associado à modulação do comportamento do tipo ansioso induzido pela STZ. Os animais do grupo STZ + BBG apresentaram maior tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Figura 8C), indicando uma atenuação das alterações comportamentais observadas após a administração da neurotoxina. Esse efeito é compatível com a hipótese de que o antagonismo do receptor P2X7 possa influenciar circuitos emocionais afetados por processos neuroinflamatórios. De forma consistente, estudos prévios demonstram que a inibição farmacológica do P2X7R reduz a ativação microglial e modula respostas comportamentais associadas ao medo e à ansiedade (Oliveira-Giacomelli *et al.* 2021; Sandeep *et al.* 2021). Ademais, esses achados estão em consonância com trabalhos liderados por Rodrigo Cunha, que apontam para o envolvimento da sinalização purinérgica, incluindo a via do receptor P2X7, na modulação de respostas ao estresse e à ansiedade, particularmente em contextos de inflamação crônica (Cunha *et al.* 2020; Gonçalves *et al.* 2022).

Resultados convergentes foram observados na porcentagem de entradas nos braços abertos, cuja análise revelou interação significativa entre STZ e BBG. Animais do grupo STZ + BBG apresentaram maior proporção de entradas nos braços abertos quando comparados aos grupos STZ e aCSF + BBG (Figura 8A), reforçando a interpretação de que o efeito protetor do BBG se manifesta de maneira consistente em múltiplos indicadores de ansiedade (Biltz *et al.* 2024). Esse padrão é compatível com achados que demonstram que o bloqueio do P2X7R reduz a hiper-reatividade da amígdala e a ativação microglial em modelos de neuroinflamação crônica (Bedetta *et al.* 2025; Kristof *et al.* 2025).

Por outro lado, a análise do número de entradas nos braços fechados, parâmetro classicamente interpretado como marcador indireto da atividade locomotora (Bruijnzeel *et al.* 2021; Shoji e Miyakawa, 2021), não revelou diferenças significativas entre os grupos (Figura 8B). Esse resultado confirma que as alterações observadas nos braços abertos não decorrem de déficits motores, permitindo concluir que as diferenças comportamentais refletem modificações emocionais específicas, e não variações na locomoção espontânea.

Por fim, o BBG administrado isoladamente não produziu efeitos significativos em nenhum dos parâmetros avaliados, sustentando a hipótese de que seus efeitos

dependem da presença prévia de um estado neuroinflamatório exacerbado, como o induzido pelo STZ. Esse achado reforça que o BBG atua predominantemente como modulador da resposta inflamatória patológica, sem interferir na ansiedade fisiológica de indivíduos saudáveis.

Em relação aos resultados da avaliação cognitiva, o teste de reconhecimento do objeto novo é amplamente utilizado na avaliação de memória de reconhecimento e de processos de familiaridade em roedores, sendo particularmente sensível a alterações nas regiões do córtex pré-frontal e do hipocampo. Considerando que a DA esporádica e os modelos baseados em neuroinflamação, como o induzido pelo STZ, frequentemente cursam com déficits de memória declarativa e reconhecimento, a inclusão desse teste permite avaliar possíveis disfunções cognitivas precoces. Além disso, este teste é considerado um ensaio de memória de curto prazo com baixa carga emocional, o que permite isolar potenciais efeitos de neuroinflamação sobre processos mnemônicos, minimizando interferências de estados emocionais como ansiedade ou depressão (Antunes e Biala, 2012; De Paula *et al.* 2021).

A análise da memória de reconhecimento de objetos revelou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, tanto na comparação global por Kruskal-Wallis quanto nas comparações múltiplas pelo teste de Dunn. No entanto, a tendência observada na comparação direta entre os grupos STZ e aCSF, com um valor de p limítrofe ($p = 0,0620$) (Figura 9), merece atenção cuidadosa. Essa tendência aponta para um possível comprometimento funcional sutil da memória de reconhecimento no grupo STZ, sugerindo que a exposição à neurotoxina pode ter iniciado um processo de disfunção cognitiva que, embora não robusto o suficiente para alcançar significância estatística neste momento, não pode ser completamente descartado do ponto de vista biológico.

Tal achado é consistente com a literatura que descreve o modelo ICV-STZ como um indutor de alterações cognitivas progressivas, muitas vezes iniciadas por disfunções sinápticas e alterações na plasticidade neural, mesmo antes de manifestações comportamentais plenamente evidentes (Khezri *et al.* 2019; Yin *et al.* 2021). Trabalhos recentes têm destacado que alterações neuroinflamatórias precoces, induzidas por estímulos como o STZ, podem comprometer circuitos de memória dependentes do hipocampo e do córtex pré-frontal, regiões fundamentais

para o desempenho em tarefas de reconhecimento (De Paula *et al.* 2021; Ferreira *et al.* 2022).

A ausência de uma reversão estatisticamente significativa pelo tratamento com BBG, apesar da melhora discreta observada no índice de reconhecimento no grupo STZ + BBG, sugere que esse efeito pode estar sujeito a diferentes interpretações. Uma possibilidade é que o intervalo entre o insulto inflamatório e a intervenção farmacológica tenha sido insuficiente para promover uma recuperação funcional robusta, ou que o modelo experimental exija um período mais prolongado para que prejuízos cognitivos sutis se tornem plenamente detectáveis nesse tipo de tarefa. Nesse sentido, estudos do grupo de Cunha e colaboradores indicam que a sinalização purinérgica pode modular aspectos da neuroplasticidade e da memória, especialmente em contextos de inflamação crônica, ressaltando que o tempo e a intensidade do estímulo inflamatório são determinantes para o grau de comprometimento e para a recuperação funcional observável (Gonçalves *et al.* 2022; Gonçalves *et al.* 2023).

Adicionalmente, a variabilidade observada nos dados individuais pode indicar que este teste, embora sensível a alterações hipocâmpais, pode não ter sido o teste mais robusto para detectar as alterações cognitivas iniciais induzidas pelo STZ sob as condições realizadas nos experimentos relatados, fato também apontado por estudos com modelos de neuroinflamação leve (Munhoz *et al.* 2020; Ferreira *et al.* 2022). Por isso, postula-se que um maior número amostral, intervalos de tempo diferentes ou o uso de testes complementares de memória podem contribuir para o esclarecimento definitivo desse achado.

Por outro lado, o labirinto em Y é um teste comportamental amplamente utilizado para a avaliação da memória espacial de trabalho, uma função cognitiva dependente da integridade funcional do hipocampo e de circuitos associados do córtex pré-frontal (Lopes *et al.* 2020). A tarefa exige que o animal recorde quais braços do labirinto foram recentemente explorados, refletindo sua capacidade de armazenamento e manipulação de informações espaciais de curto prazo.

No presente estudo, embora tenha sido observada uma redução no índice de alternância espontânea no grupo STZ, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, tanto nas análises

paramétricas quanto nas não paramétricas (Figura 10). Esses resultados indicam que, nas condições avaliadas, o protocolo de indução do modelo STZ não foi suficiente para promover alterações detectáveis na memória de trabalho espacial.

Essa preservação pode estar relacionada a uma característica já descrita em modelos de neurodegeneração: os circuitos responsáveis pela memória de curto prazo frequentemente resistem mais às fases iniciais da neuroinflamação, com alterações mais precoces ocorrendo preferencialmente em tarefas de memória de longo prazo (Mousavi *et al.* 2021; da Silva *et al.* 2022). Além disso, é importante destacar que o processamento da memória de trabalho parece envolver um limiar inflamatório mais elevado para que alterações comportamentais se tornem detectáveis, fato sustentado por achados recentes que apontam para uma maior vulnerabilidade de tarefas que exigem consolidação e recuperação de memórias de longa duração em comparação àquelas que envolvem armazenamento temporário de informações (Li *et al.* 2021; Wang *et al.* 2023).

O tratamento com BBG, por sua vez, não promoveu efeitos na memória espacial de trabalho, o que é coerente com a hipótese de que o receptor P2X7 exerce papel mais crítico na manutenção de processos inflamatórios sustentados, e que sua inibição impacta principalmente domínios cognitivos mais sensíveis ao processo neuroinflamatório crônico, como a memória declarativa e a memória emocional (Gonçalves *et al.* 2022).

Frente aos resultados obtidos em conjunto com os achados descritos em outros testes comportamentais anteriores, a hipótese mais plausível é que os efeitos deletérios do STZ e os efeitos neuroprotetores do BBG são mais pronunciados em domínios cognitivos dependentes de integridade sináptica de longo prazo e do controle glial da neuroinflamação sustentada, enquanto a memória de trabalho espacial, avaliada pelo labirinto em Y, permanece funcionalmente preservada nas condições testadas, provavelmente devido à menor vulnerabilidade desse domínio aos estágios iniciais de neuroinflamação.

A utilização do teste de esQUIVA passiva permitiu investigar dois momentos críticos da memória aversiva: a memória de curto prazo, avaliada 15 minutos após o treinamento, e a memória de longo prazo, 24 horas após a exposição ao estímulo aversivo. Este teste é amplamente consolidado para o estudo de aprendizagens

associativas com carga emocional, sendo especialmente sensível a disfunções na plasticidade sináptica de estruturas como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (Prediger *et al.* 2008; Moreira-Silva *et al.* 2023).

No presente trabalho, os resultados indicaram uma tendência a prejuízo na memória recente no grupo STZ, ainda que sem alcançar significância estatística ($p = 0,0866$). Apesar disso, a redução na latência de descida observada já sugere que o ambiente neuroinflamatório induzido pelo STZ exerce algum grau de interferência nos mecanismos iniciais de consolidação da memória aversiva, achado este que se apresenta em consonância com evidências prévias que relacionam a ativação sustentada de micróglia e a liberação de citocinas pró-inflamatórias a déficits em tarefas envolvendo memória emocional (da Silva *et al.* 2022; Gomes *et al.* 2022).

Contudo, é justamente nesse ponto que emerge o principal achado deste estudo: o efeito protetor do BBG. Animais do grupo STZ + BBG apresentaram desempenho significativamente superior ao grupo STZ na memória recente, atingindo latências de resposta comparáveis às do grupo controle (Figura 11). Ou seja, o antagonismo do receptor P2X7 foi capaz de prevenir o déficit cognitivo induzido pelo STZ, o que reforça a hipótese de que a modulação precoce da neuroinflamação é determinante para a preservação dos processos de consolidação de curto prazo. Tais resultados ecoam achados recentes que demonstram os efeitos benéficos do bloqueio do P2X7R frente a déficits de memória relacionados à inflamação sistêmica e central (Mancinelli *et al.* 2021; Gonçalves *et al.* 2023).

Em contraste, os dados referentes à memória tardia revelaram um padrão diferente: nenhum dos grupos apresentou diferenças estatisticamente significativas após 24 horas, seja em comparação ao grupo controle (aCSF) ou entre os grupos tratados com STZ e STZ + BBG, sugerindo que o impacto do STZ se manifesta de forma mais pronunciada na consolidação inicial da memória, com efeito atenuado sobre os mecanismos de retenção em longo prazo. Essa distinção é coerente com a literatura, que aponta que a memória de longa duração depende de mecanismos adicionais de consolidação sináptica e de reprogramações transcricionais mais profundas, menos suscetíveis à neuroinflamação aguda (Munhoz *et al.* 2020; Wang *et al.* 2023).

Em conjunto, os resultados obtidos nos diferentes paradigmas comportamentais compõem um cenário robusto e coerente, que fortalece significativamente a hipótese central desta tese: a modulação da sinalização purinérgica via antagonismo do receptor P2X7 representa uma estratégia promissora para prevenir, ou atenuar, os déficits cognitivos e emocionais associados à neuroinflamação induzida por STZ.

Inicialmente, os dados obtidos no teste de campo aberto asseguraram a integridade da atividade locomotora entre os grupos experimentais, afastando a possibilidade de viés motor e conferindo validade interna aos resultados observados nos testes subsequentes. A partir desse controle fundamental, emergiram alterações comportamentais relevantes no teste do nado forçado, no qual os animais do grupo STZ apresentaram um perfil compatível com comportamento do tipo depressivo, caracterizado pelo aumento do tempo de imobilidade. A administração de BBG esteve associada à atenuação desse efeito, prevenindo o aumento da imobilidade induzido pela STZ e promovendo valores comparáveis aos observados nos grupos controle.

Um padrão similar de proteção emocional foi identificado no LCE, onde o BBG também atenuou comportamentos do tipo ansioso induzidos pelo STZ, com efeitos consistentes tanto no tempo quanto na proporção de entradas nos braços abertos, indicando um efeito protetor amplo e replicável. Esses efeitos, vale destacar, ocorreram sem interferência em parâmetros de locomoção, reforçando seu caráter específico.

No domínio da cognição, o BBG demonstrou preservar significativamente a memória aversiva de curto prazo no teste de esquiva passiva, revertendo a tendência a prejuízo observada no grupo STZ e confirmando seu papel protetor sobre processos mnemônicos vulneráveis à neuroinflamação inicial.

Embora os testes de reconhecimento de objeto e memória de trabalho espacial não tenham revelado diferenças estatisticamente significativas, as tendências observadas, como a melhora discreta com BBG e a preservação funcional no grupo STZ, sugerem que esses domínios cognitivos podem ser menos suscetíveis à neuroinflamação aguda.

Assim, o padrão de resultados aqui apresentado não apenas reforça a validade do modelo experimental adotado, como evidencia de forma clara e integrada

que o BBG exerce efeitos neurocomportamentais seletivos e benéficos em múltiplas dimensões do comportamento, um achado que alinha plausibilidade neurobiológica, consistência estatística e relevância translacional em um único corpo de evidências.

Embora a STZ seja reconhecida por seu potencial diabetogênico quando administrada por vias sistêmicas, como a intraperitoneal, esse efeito depende da dose e do acesso da substância ao pâncreas, onde provoca citotoxicidade seletiva às células β das ilhotas de Langerhans (Grieb, 2016; Ghasemi e Jeddi, 2023). Já no contexto da administração central, como a realizada por via ICV, a STZ atua preferencialmente sobre estruturas encefálicas sensíveis à sinalização insulínica, como o hipocampo e o córtex pré-frontal, sem comprometer diretamente o controle glicêmico periférico (Salkovic-Petrisic *et al.* 2023) e essa distinção entre modelos metabólicos e neurodegenerativos é essencial.

Com base na literatura científica atual, há forte respaldo para a distinção entre os modelos sistêmicos de hiperglicemia e o modelo i.c.v de STZ no contexto de alterações cerebrais. A hiperglicemia crônica, típica do diabetes sistêmico, está associada a um estado inflamatório sistêmico de baixo grau, aumento de espécies reativas de oxigênio e disfunção endotelial, que impactam negativamente a integridade da barreira hematoencefálica e a função neuronal (Dantas *et al.* 2025; Sharif-Askari *et al.* 2025). Em contrapartida, o modelo i.c.v de STZ induz lesão seletiva no SNC, sem provocar hiperglicemia periférica, mimetizando de forma eficaz aspectos da DA esporádica, como a resistência insulínica cerebral, neuroinflamação localizada e comprometimento cognitivo precoce (Moreira *et al.* 2009; Grieb, 2016).

Diversos estudos já demonstraram que o modelo i.c.v de STZ reproduz com fidelidade alterações moleculares da DA, incluindo prejuízos na via PI3K/Akt, ativação de micróglia e aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Salkovic-Petrisic *et al.* 2013; Knezovic *et al.* 2015; Ethiraj *et al.* 2020) reforçando seu valor translacional para a compreensão dos mecanismos patológicos centrais da doença.

Quanto aos resultados obtidos neste estudo, demonstrou-se aqui que a administração i.c.v. de STZ, na dose e cronograma adotados, não induziu alterações significativas nos níveis glicêmicos dos animais, apontando para uma estabilidade entre os grupos (aCSF e STZ) ao longo de 19 dias, sem diferenças significativas entre os mesmos ou em relação ao tempo (D0 vs. D19) (Figura 12). Esses dados confirmam

a ausência de um fenótipo diabético periférico, reforçando que os efeitos neurocomportamentais e bioquímicos descritos a seguir refletem alterações centrais, e não consequências de disfunções metabólicas sistêmicas.

Este perfil bioquímico, associado aos achados comportamentais descritos anteriormente, dá suporte à hipótese central de que os danos cognitivos e emocionais observados no modelo i.c.v de STZ são consequência direta da neuroinflamação central e da disfunção da sinalização insulínica no cérebro, com participação crítica da via purinérgica P2X7, e não de alterações metabólicas periféricas.

O MDA, quantificado pelo ensaio de TBARS, é amplamente reconhecido como um dos marcadores bioquímicos mais clássicos de estresse oxidativo, refletindo o grau de peroxidação lipídica nas membranas celulares (Agrawal *et al.* 2021). Esse processo ocorre quando há excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) no ambiente intracelular, o que leva à oxidação dos lipídios que compõem as membranas neurais. O aumento de MDA indica, portanto, danos estruturais à integridade das células nervosas, com consequente prejuízo na sinalização sináptica, na plasticidade e na viabilidade neuronal (Agrawal *et al.* 2021; da Silva *et al.* 2022).

No contexto da DA, o estresse oxidativo é considerado um dos primeiros eventos patológicos, ocorrendo muitas vezes antes mesmo da formação de placas amiloides ou da deposição de proteína tau hiperfosforilada (Butterfield e Halliwell, 2019). A geração de EROs no tecido cerebral pode ser impulsionada por diversos fatores, incluindo disfunção mitocondrial, ativação microglial exacerbada e sinalização inflamatória descontrolada, sendo o P2X7R uma peça central nessa cascata (Mancinelli *et al.* 2021; Gonçalves *et al.* 2023).

É notável que os animais do grupo STZ apresentaram um aumento expressivo nos níveis de MDA no hipocampo (Figura 13A), evidenciando que o modelo de neurodegeneração induzido foi suficiente para gerar um contexto oxidativo marcadamente desfavorável, exatamente em uma das regiões mais críticas para o processamento de memória e aprendizagem. Essa elevação no hipocampo dialoga diretamente com os déficits comportamentais descritos anteriormente, especialmente os relacionados à memória aversiva e ao comportamento emocional, corroborando a hipótese de que o estresse oxidativo é um elo bioquímico entre a neuroinflamação e a disfunção cognitiva (Moreira-Silva *et al.* 2023).

No córtex pré-frontal, embora a ANOVA de duas vias não tenha revelado diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 13B), observou-se uma tendência de aumento nos níveis de MDA no grupo STZ, acompanhada de uma redução discreta no grupo tratado com BBG. Essa modulação parcial, ainda que sem significância estatística formal, sugere uma possível atenuação do estresse oxidativo também nesta região, a qual tem papel reconhecido na modulação de estados emocionais e em funções executivas (da Silva *et al.* 2022).

O que merece destaque especial, contudo, é o efeito do BBG no hipocampo. A redução significativa nos níveis de MDA reforça que o bloqueio do P2X7R foi capaz de interferir positivamente na cascata de eventos pró-oxidativos desencadeados pelo STZ, possivelmente por limitar a ativação microglial e reduzir a liberação de mediadores inflamatórios e oxidantes (Gomes *et al.* 2022; Gonçalves *et al.* 2023). Ainda que no CPF esse efeito não tenha atingido significância estatística, a concentração dos valores do grupo STZ + BBG próximos aos do controle, acompanhada por menor dispersão dos dados, sugere uma resposta biológica moderadamente uniforme ao tratamento.

Ou seja, os achados observados no hipocampo e no córtex pré-frontal convergem para a noção de que o BBG exerce um efeito neuroprotetor frente à peroxidação lipídica induzida pelo STZ, com maior intensidade em regiões mais vulneráveis, como o hipocampo, mas ainda com sinais discretos de benefício também no CPF. Essa distribuição regional do efeito antioxidante reforça a especificidade e a consistência do BBG como possível modulador da cascata oxidativa associada à neuroinflamação.

O estresse nitrosativo tem sido apontado, nos últimos anos, como um dos principais mecanismos moleculares que conectam a neuroinflamação crônica aos danos estruturais e funcionais observados em doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (Bai *et al.* 2020).

Entre os mediadores mais envolvidos nesse processo está o óxido nítrico (NO), uma molécula de sinalização que, em concentrações fisiológicas, exerce papéis neuroprotetores, mas que, quando produzida em excesso, passa a atuar como um agente neurotóxico (Ghasemi-Kasman *et al.* 2021). Essa dualidade funcional do NO é especialmente relevante em contextos onde a ativação imunoneural desregulada

favorece a sua superprodução, como ocorre diante da ativação sustentada de microglias e da indução do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Yuste *et al.* 2015; Grotelli *et al.* 2020).

Na presente pesquisa, os dados de nitrito revelaram uma resposta inflamatória nitrosativa nitidamente pronunciada no hipocampo de animais do grupo STZ (Figura 14A), com aumento significativo na produção de NO, refletindo uma possível ativação de vias pró-inflamatórias. Esse achado é particularmente relevante por ocorrer justamente em uma das regiões mais vulneráveis e críticas para o processamento da memória e da emoção. Ou seja, a elevação de nitrito observada aqui não se apresenta de forma isolada, mas dialoga diretamente com o padrão bioquímico de aumento do MDA, marcador de estresse oxidativo, também detectado no hipocampo, compondo um quadro redox sinérgico.

Juntos, esses achados sustentam a hipótese de que a neurotoxicidade induzida pelo STZ desencadeia uma cascata de eventos oxidativo-nitrosativos coordenados, comprometendo a homeostase sináptica, a integridade celular e, como discutido anteriormente, contribuindo para os déficits comportamentais em tarefas de cunho cognitivo e emocional.

A convergência entre o estresse oxidativo, o estresse nitrosativo e os prejuízos comportamentais reforça a ideia de que o hipocampo foi um dos principais alvos do insulto neuroinflamatório promovido pelo STZ, e que a administração do BBG, embora não tenha sido suficiente para normalizar os níveis de nitrito ao patamar do grupo controle, promoveu uma modulação biológica relevante.

A análise dos dados relacionados à resposta inflamatória revelou uma redução visual dos valores medianos, acompanhada por menor dispersão intragrupo nos animais tratados com BBG, sugerindo uma resposta mais homogênea sob a modulação do receptor P2X7. Embora essas alterações não tenham alcançado significância estatística formal, o padrão observado indica uma possível influência do bloqueio do P2X7 sobre a variabilidade da resposta inflamatória induzida pelo modelo. Do ponto de vista biológico, esse tipo de uniformização pode refletir uma modulação parcial de processos inflamatórios subjacentes, sem implicar necessariamente uma reversão completa do estado inflamatório estabelecido. Essa interpretação é compatível com evidências prévias que demonstram a capacidade do BBG de

interferir em vias associadas à ativação microglial e à expressão de mediadores inflamatórios, incluindo iNOS, especialmente em contextos de inflamação crônica (Wen *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2023).

Já no córtex pré-frontal, o padrão foi diferente, mas igualmente revelador. Os níveis de nitrito não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 14B), e o tratamento com BBG tampouco exerceu efeitos detectáveis. Embora à primeira vista isso possa parecer um resultado neutro, ele na verdade reforça uma característica temporal importante da progressão neuroinflamatória: o hipocampo parece ser atingido de forma mais precoce e intensa, enquanto o CPF pode demandar uma exposição mais prolongada ao insulto inflamatório para manifestar alterações bioquímicas relevantes. Esse padrão regional assimétrico é coerente com estudos que apontam para diferentes limiares de vulnerabilidade entre áreas corticais e límbicas, especialmente em modelos experimentais de AD esporádica (Xie *et al.* 2020; Zhao *et al.* 2022).

Quando analisados de forma integrada, os dados bioquímicos obtidos nesta tese apontam para a ocorrência de alterações inter-relacionadas após a administração central de STZ, compatíveis com a instalação de um estado neuroinflamatório. Nesse contexto, o modelo experimental parece estar associado à ativação precoce de micróglias e ao aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, eventos frequentemente descritos como componentes iniciais da resposta inflamatória no sistema nervoso central. A presença de um ambiente inflamatório sustentado pode favorecer o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, e, nesse sentido, o aumento dos níveis de MDA observado no hipocampo pode refletir um maior estresse oxidativo associado à disfunção induzida pela STZ.

O aumento dos níveis de MDA observado no hipocampo pode refletir esse estado pró-oxidativo inicial, com comprometimento da integridade das membranas celulares e das sinapses. Em seguida, a persistência desse ambiente inflamatório parece ter desencadeado a ativação de vias produtoras de NO, culminando no acúmulo de espécies reativas de nitrogênio, como o nitrito, também mais pronunciado no hipocampo. A interação dessas espécies oxidativas e nitrosativas pode ter amplificado o dano mitocondrial e sináptico, gerando um ciclo de disfunção celular que se expressa em alterações comportamentais detectáveis.

É plausível, portanto, considerar que o BBG, ao antagonizar o receptor P2X7, tenha interferido em pontos-chave dessa cascata patológica. Ainda que sem reverter totalmente os níveis de nitrito, sua ação parece ter contido a instabilidade da resposta inflamatória e limitado a progressão dos danos oxidativos. Esses efeitos, ao se refletirem na melhora de parâmetros comportamentais, sugerem que a modulação da sinalização purinérgica representa uma estratégia promissora não apenas para mitigar danos já instaurados, mas principalmente para estabilizar o ambiente neuroquímico em estágios iniciais da neurodegeneração.

Ao investigar a ativação microglial na região CA1 do hipocampo, os dados obtidos revelaram uma narrativa biológica clara e coerente: em condições fisiológicas, os níveis de micróglia permanecem estáveis e discretamente distribuídos, como demonstrado nos grupos aCSF e aCSF+BBG (Figura 15). A ausência de diferenças significativas entre esses dois grupos sugere que o bloqueio dos receptores P2X7 pelo BBG, por si só, não altera o tônus imunológico basal, o que se torna de grande relevância ao avaliarmos a especificidade dessa intervenção farmacológica (Illes *et al.* 2020).

No entanto, esse cenário muda de forma abrupta com a administração i.c.v de STZ. O grupo STZ apresentou um aumento marcante na densidade de micróglia, mais que dobrando o número de células Iba-1 positivas em relação ao grupo controle. Essa expansão microglial não apenas confirma a eficácia do modelo em gerar neuroinflamação, como também revela o hipocampo, em especial a sub-região CA1, como um dos principais alvos da resposta inflamatória central desencadeada pela STZ, corroborando achados já descritos anteriormente (Nagayach *et al.* 2014).

A intensificação da resposta microglial observada no grupo tratado com STZ não representa um evento isolado, mas sim parte de um cenário neurobiológico mais complexo. Nesse contexto, a administração de STZ desencadeia um processo degenerativo caracterizado por estresse oxidativo, perda de integridade sináptica e ruptura da regulação glial. Esses elementos interagem de forma sinérgica para criar um microambiente cerebral tóxico, no qual a micróglia desempenha um papel central, atuando como mediadora da transição entre injúria inicial e perpetuação da neurodegeneração (Bhattacharya e Biber, 2016)

A partir da neuroinflamação estabelecida, surge um dado de especial interesse: a administração de BBG em animais STZ levou a uma redução significativa na densidade microglial, com valores próximos aos níveis fisiológicos. Essa reversão não ocorreu de forma inespecífica, mas parece refletir uma ação direcionada ao controle da ativação patológica via bloqueio do receptor P2X7, um dos principais sensores de ATP extracelular e amplificadores da resposta inflamatória no sistema nervoso central (Wang *et al.* 2020).

Visualmente, essa modulação pode ser claramente percebida nas imagens de imunofluorescência (Figura 15B). O padrão denso e ramificado da marcação Iba-1 no grupo STZ contrasta nitidamente com a configuração mais esparsa e menos reativa nos grupos controle e STZ+BBG. Essa diferença morfológica reforça os achados quantitativos, sinalizando que o BBG não apenas reduz a densidade de micróglia, mas pode também interferir em seu estado de ativação fenotípica.

Tais evidências são consistentes com trabalhos recentes que demonstram que a inibição do P2X7 resulta em menor produção de citocinas pró-inflamatórias, redução da neurotoxicidade e melhora da plasticidade sináptica em diversos modelos neurodegenerativos, incluindo a DA (Chen *et al.* 2021).

Portanto, ao reduzir a densidade microglial em um modelo que simula a DA esporádica, o BBG se manifesta como um modulador seletivo e promissor, capaz de interferir em pontos-chave da neuroinflamação sem comprometer a vigilância imunológica basal. E frente aos achados aqui apresentados, sugere-se que o efeito do BBG vá além de um simples bloqueio farmacológico, representando uma espécie de “freio” imunológico que atua seletivamente em contextos de inflamação desregulada, promovendo a restauração de um microambiente neural mais próximo do contexto fisiológico.

Já a análise tridimensional da micróglia revelou alterações morfológicas significativas na região CA1 do hipocampo após a administração de i.c.v de STZ, configurando um fenótipo hiper ramificado compatível com ativação celular exacerbada (Cardinali *et al.* 2025). Este achado é consistente com o conceito de que, em contextos neurodegenerativos, como no modelo esporádico da DA induzido por STZ, a micróglia sofre uma transformação morfofuncional que a posiciona como agente central da resposta inflamatória local (Heneka *et al.* 2015). O aumento

significativo no número de interseções entre 8 e 24 micrômetros do soma reflete uma arborização extensa, que pode ser interpretada como um marcador morfológico de hipervigilância e reatividade, ampliando a interface da célula com sinapses e estruturas perivasculares (Diaz-Aparicio *et al.* 2020) (Figura 16A).

A ativação morfológica observada não ocorre de maneira isolada, mas é orquestrada por vias sinalizadoras específicas, com destaque para o receptor purinérgico P2X7 (Han *et al.* 2024). Este receptor é altamente expresso em micróglia reativas e é sensível a elevações de ATP extracelular, típico de ambientes lesivos e degenerativos (Franke *et al.* 2012; Illes *et al.* 2020). Sua ativação resulta em formação de poros transmembrana e ativação do inflamassoma NLRP3, culminando na liberação de IL1 beta e outras citocinas pró-inflamatórias (Skaper *et al.* 2010; Martins *et al.* 2021). No presente estudo, o uso de BBG, antagonista seletivo de P2X7R, reduziu significativamente o número de interseções, aproximando-o dos níveis basais, o que sugere não apenas um efeito morfológico, mas um provável redirecionamento funcional da micróglia para um estado menos reativo e mais homeostático.

Essa modulação não se restringiu à complexidade espacial dos prolongamentos, visto que o comprimento total dos processos também apresentou uma elevação marcante no grupo STZ (Figura 16B), sugerindo uma tentativa da micróglia de ampliar sua cobertura territorial. Tal extensão dos processos tem sido associada à intensificação da vigilância sináptica e ao aumento da liberação de mediadores inflamatórios (Monif *et al.* 2010; Savage *et al.* 2019). A redução dessa extensão no grupo tratado com BBG evidencia que a inibição da sinalização purinérgica por meio do bloqueio do receptor P2X7 é capaz de conter a expansão morfológica associada ao estado reativo da micróglia. Essa limitação na plasticidade estrutural reflete, por sua vez, uma menor capacidade de resposta imune exacerbada, já que a elongação dos processos está funcionalmente associada à amplificação do contato com sinapses e à liberação de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, o efeito modulador do BBG parece não apenas atenuar a morfologia reativa, mas possivelmente contribuir para restaurar um equilíbrio neuroimunológico mais próximo do estado fisiológico.

Em paralelo, o número de processos por célula também foi sensivelmente ampliado pelo tratamento com STZ, um achado que reforça o padrão de ativação

morfológica generalizada (Martin *et al.* 2019) (Figura 16C). A presença de múltiplos prolongamentos não só amplia a conectividade microglial com o microambiente, mas também favorece a fagocitose aberrante de sinapses, um mecanismo implicado na perda sináptica precoce observada em estágios iniciais da DA (Schafer *et al.* 2013; Hong *et al.* 2016). O fato de que o BBG reduziu esse número de forma significativa, embora sem retorno completo aos níveis de base, indica que existe uma neuroproteção sendo exercida, ainda que de forma parcial, mas suficiente para sugerir um reposicionamento do fenótipo microglial em direção a um estado menos deletério.

Além disso, essas evidências morfológicas ganham robustez adicional ao serem integradas com as imagens representativas das reconstruções tridimensionais. No grupo STZ, observa-se uma arquitetura densa e complexa, com prolongamentos longos e ramificados que ocupam grande volume do tecido (Figura 16D). Em contraste, as micróglia do grupo controle apresentam morfologia compacta e menos exuberante, enquanto no grupo STZ+BBG, as células exibem um padrão intermediário, caracterizado por prolongamentos mais curtos e menos numerosos, porém ainda mais desenvolvidos do que nos controles. Essa progressão visual não apenas valida os dados quantitativos, mas evidencia uma transição morfofuncional que pode ser manipulada por intervenções farmacológicas específicas.

A relevância translacional desses achados está relacionada à vulnerabilidade da região CA1 do hipocampo na DA, reconhecida como uma das primeiras áreas a apresentar degeneração sináptica e prejuízo funcional (De Strooper e Karran, 2016). Nesse contexto, a modulação do fenótipo reativo da micróglia por meio do bloqueio do receptor P2X7 pode representar uma estratégia potencial para interferir, ainda que parcialmente, nos processos que sustentam a cascata neuroinflamatória associada à disfunção hipocampal. Esse aspecto torna-se particularmente relevante considerando que a persistência de micróglia ativadas em regiões sinapticamente ativas tem sido associada não apenas à perda sináptica, mas também à progressão de patologias relacionadas ao acúmulo de β -amiloide e tau (Leng e Edison, 2021).

A capacidade do BBG de induzir uma morfologia menos complexa, menos extensa e com menor número de processos aponta para um redesenho funcional da micróglia, indicando uma transição do fenótipo reativo para um estado mais próximo da vigilância homeostática. Essa modulação morfológica não é apenas estrutural, mas

sinaliza um reequilíbrio da atividade neuroimune, com potencial redução da liberação de mediadores inflamatórios e preservação da arquitetura sináptica.

Em um cenário em que terapias anti-inflamatórias sistêmicas demonstraram eficácia limitada devido à falta de especificidade celular (Heneka *et al.* 2015; Salter e Stevens, 2017; Hansen *et al.* 2018), intervenções direcionadas, como o bloqueio seletivo do P2X7R, emergem como alternativas promissoras por atuarem sobre os mecanismos inflamatórios locais sem comprometer as funções basais da micróglia. Assim, os achados morfológicos obtidos associados ao tratamento com o BBG reforçam seu potencial translacional como ferramenta terapêutica para contenção da neuroinflamação em doenças neurodegenerativas, ao interferir de maneira precisa na dinâmica estrutural e funcional da micróglia ativada.

A região CA1 do hipocampo é particularmente sensível a insultos neuroinflamatórios e frequentemente figura entre os primeiros alvos de disfunção em modelos experimentais de neurodegeneração (Esmaili *et al.* 2025). No presente estudo, a administração i.c.v de STZ promoveu um aumento acentuado na densidade de astrócitos GFAP-positivos nessa região (Figura 17), caracterizando um estado importante de astrogliose reativa robusta, compatível com a literatura que descreve o modelo i.c.v de STZ como um indutor confiável de neuroinflamação sustentada, caracterizada por desregulação metabólica, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e comprometimento da função sináptica (Ali e Ali, 2022; Dunacka *et al.* 2024).

A relevância desse achado vai além da simples presença de glia reativa, uma vez que, em contextos de neurodegeneração, astrócitos hiperativos deixam de atuar como reguladores homeostáticos e passam a contribuir diretamente para a progressão do dano neuronal (Gildea e Liddelow, 2025). O aumento na expressão de GFAP observado no grupo STZ transcende a simples proliferação astrocitária, mas sinaliza uma transição fenotípica crítica: de uma célula dedicada ao suporte metabólico, à regulação da homeostase iônica e à manutenção da neurotransmissão glutamatérgica, para uma célula reativa, neurotóxica, funcionalmente remodelada.

Nessa nova configuração, astrócitos deixam de realizar tarefas protetivas e passam a amplificar a resposta inflamatória local por meio da liberação exacerbada de citocinas como interleucina 1 beta (IL1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α),

bem como de glutamato extracelular, contribuindo diretamente para excitotoxicidade e disfunção sináptica (Liddelow *et al.* 2017; Brambilla, 2019).

Essa reatividade glial sustentada compromete de forma significativa circuitos neuronais essenciais à cognição e à regulação comportamental, como as vias entorino-hipocampais, responsáveis pela consolidação da memória episódica, e os circuitos CA3-CA1, fundamentais para a codificação espacial e a plasticidade sináptica dependente de NMDA (Igarashi, 2023). Além disso, o excesso de glutamato e citocinas inflamatórias prejudica a sinalização trófica no hipocampo e na amígdala, regiões críticas para o processamento emocional e respostas adaptativas ao estresse (Dunacka *et al.* 2024). Em última análise, astrócitos reativos deixam de ser coadjuvantes do equilíbrio neural e passam a atuar como moduladores ativos da disfunção progressiva observada em modelos de neurodegeneração

É frente a este cenário de desregulação glial que o BBG se destaca. O tratamento com o antagonista P2X7R exerceu efeito neuroprotetor, de forma tão contundente, à reatividade astrocitária induzida por STZ, que foi capaz de manter os níveis de GFAP em patamares estatisticamente indistinguíveis dos controles. Tal efeito não é trivial, a reversão da astrogliose não apenas interrompe o ciclo da inflamação, como favorece o restabelecimento da homeostase sináptica e da função glial, o que pode ter repercussões diretas sobre a melhora comportamental evidenciada nos testes de ansiedade, depressão e memória emocional.

Do ponto de vista mecanístico, a via do P2X7 é um alvo estratégico. Este receptor, expresso em microglias e astrócitos, atua como um sensor de dano celular e, quando ativado de forma persistente, desencadeia uma cascata que inclui influxo de cálcio, ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Monif *et al.* 2010; Bhattacharya e Biber, 2016). A ação do BBG, ao bloquear essa rota, pode representar um ponto de intervenção *upstream*, interrompendo o recrutamento glial e limitando o impacto neuroinflamatório desde seus primeiros estágios. Essa hipótese é ainda mais fortalecida pelo fato de que o BBG, quando administrado em animais controle, não alterou o padrão basal de expressão de GFAP, sendo um indicativo de seletividade funcional, desejável em qualquer agente neuroativo (Oliveira-Giacomelli *et al.* 2021).

Além disso, os achados histológicos se alinham perfeitamente com os dados comportamentais previamente descritos. Os animais do grupo STZ exibiram comportamento do tipo depressivo, aumento no fenótipo tipo-ansioso e apresentaram prejuízo na memória aversiva recente; alterações amplamente associadas à disfunção do eixo glia-sinapse em modelos inflamatórios (Heneka *et al.* 2015; Semyanov e Verkhatsky, 2021). A prevenção dessas alterações pelo BBG não pode ser atribuída apenas à modulação microglial: a contenção da astrogliose, especialmente em uma região tão crítica quanto a CA1, emerge como um componente essencial da resposta terapêutica observada.

Portanto, o conjunto dos resultados obtidos nesta etapa reforça o papel do BBG como possível modulador eficaz da neuroinflamação induzida por STZ. Ao reduzir a ativação astrocitária, o BBG atua não apenas sobre o componente histológico da inflamação, mas parece interferir funcionalmente na dinâmica dos circuitos neurais relacionados à memória e ao comportamento emocional.

A reconstrução tridimensional dos astrócitos revelou mudanças marcantes em sua morfologia quando expostos ao modelo de neurodegeneração induzido por STZ. No grupo tratado com STZ, observou-se uma expansão significativa da arborização astrocitária, refletida pelo aumento expressivo no número de interseções em quase todas as distâncias radiais analisadas, com pico de complexidade entre 8 e 16 μm (Figura 18A). Esse padrão de ramificação ampliada é consistente com a ativação reativa dos astrócitos, comumente descrita em contextos de inflamação persistente no sistema nervoso central, como observado em modelos experimentais da doença de Alzheimer esporádica (Bellaver *et al.* 2021; Escartin *et al.* 2021). A reorganização estrutural, especialmente quando acompanha aumento de complexidade nos domínios perissomáticos, pode indicar uma tentativa da célula de adaptar-se ao microambiente alterado, modulando a disponibilidade de neurotransmissores e sinalizando a outras células da glia e neurônios próximos (Anderson e Sofroniew, 2014). Nesse contexto, os astrócitos não apenas reagem ao dano, mas passam a integrar ativamente o eixo de resposta neural, atuando como reguladores da atividade sináptica e da integridade tecidual (Di Castro e Volterra, 2022). A expansão dos prolongamentos pode estar relacionada ao aumento da captação de glutamato, da liberação de fatores tróficos ou da reorganização dos contatos com capilares e

sinapses, todos os eventos já documentados em condições de estresse inflamatório prolongado (Pérez-Catalán *et al.* 2021).

A ampliação da complexidade astrocitária no grupo STZ não se resume ao aumento do número de processos ou da sua extensão. O que se observa é uma verdadeira reorganização territorial, na qual os astrócitos parecem modificar seus domínios de influência, expandindo a área de contato com sinapses, vasos e outras células gliais (Mishra *et al.* 2024). Essa redistribuição estrutural tem implicações funcionais importantes, pois afeta diretamente a capacidade dessas células em regular o microambiente extracelular, controlar a captação de neurotransmissores e manter o equilíbrio iônico e metabólico da rede neural (Muñoz de León-López *et al.* 2025). Em modelos de lesão, como o induzido por STZ, essas mudanças morfológicas frequentemente refletem tentativas compensatórias da glia em restaurar a estabilidade tecidual, atuando como uma barreira funcional contra o avanço da inflamação (Xu *et al.* 2023). No entanto, essa resposta adaptativa pode ter um custo: o excesso de ramificações pode levar à perda de especificidade sináptica, ao comprometimento da transmissão neural e, paradoxalmente, à perpetuação do estado inflamatório (Anderson e Sofroniew, 2014). Nesse cenário, a hipertrofia glial assume um papel ambíguo em que, ao mesmo tempo em que tenta conter o dano, pode amplificar desequilíbrios no funcionamento da rede neural local.

Contudo, um dos achados mais instigantes desta análise emerge do grupo aCSF tratado com BBG (aCSF+BBG). Isso porque, mesmo na ausência de qualquer agente lesivo, os astrócitos exibiram alterações morfológicas substanciais, com aumento na complexidade da arborização, maior número de interseções e prolongamentos mais extensos (Figura 18D). Inicialmente, essa resposta pode parecer contraintuitiva, pois seria esperado que, em condições fisiológicas, o bloqueio de um receptor tipicamente associado à resposta inflamatória, como o P2X7, não produzisse alterações estruturais tão evidentes. No entanto, estudos recentes apontaram que o P2X7 exerce funções além da mediação inflamatória, participando ativamente da manutenção da estrutura basal dos astrócitos (Zhao *et al.* 2021). Ou seja, em estados de repouso, esse receptor contribui para o equilíbrio da excitabilidade glial e para a regulação da liberação de sinais purinérgicos, mantendo os astrócitos em um padrão morfológico compacto e funcionalmente vigilante

(Rotondo *et al.* 2022). Assim, o bloqueio do P2X7 pelo BBG pode, paradoxalmente, liberar mecanismos de crescimento celular que estavam tonicamente inibidos, promovendo um estado de plasticidade que se reflete na expansão dos processos e na reorganização da célula no espaço neural (Zhao *et al.* 2021). E isso sugere que o sistema purinérgico não apenas responde a estímulos patológicos, mas atua como regulador constante da arquitetura glial, mesmo em contextos de aparente homeostase.

Já o perfil morfológico dos astrócitos no grupo tratado com STZ seguido de BBG (STZ+BBG) revela uma dinâmica particularmente reveladora: a administração do BBG, após o insulto neurotóxico, foi capaz de prevenir parcialmente a expansão exacerbada da arborização glial observada no grupo STZ. O número de processos (Figura 18C) e o comprimento total dos prolongamentos (Figura 18B) se mantiveram em níveis comparáveis aos do grupo controle (aCSF), indicando uma capacidade de contenção morfológica induzida pelo bloqueio do P2X7R (Valenza *et al.* 2021). No entanto, a complexidade radial permaneceu discretamente elevada nas regiões mais próximas ao soma, sugerindo uma reorganização seletiva em vez de uma simples manutenção estrutural. Essa dissociação entre os eixos de complexidade e extensão morfológica pode refletir uma “poda” direcionada dos prolongamentos distais, com preservação das ramificações centrais, estratégia que indicaria um ajuste fino da resposta glial frente ao ambiente inflamatório (Chiarini *et al.* 2023).

Esse padrão de remodelação não aleatória reforça a ideia de que o BBG atua mais como um modulador do que como um supressor da reatividade astrocitária (Illes *et al.* 2021). Ao interferir na sinalização do P2X7, o BBG parece interromper o ciclo de retroalimentação inflamatória sustentado pelos astrócitos, sem anular completamente sua capacidade de resposta (Sidoryk-Węgrzynowicz e Strużyńska, 2021). Essa reorganização seletiva pode ser funcionalmente vantajosa, preservando a capacidade da glia de monitorar o ambiente sináptico sem promover os excessos estruturais associados à disfunção o que, em termos translacionais, trata-se de uma propriedade relevante: um agente capaz de regular, e não suprimir, pode representar uma ferramenta terapêutica mais precisa em doenças como a DA, onde o excesso e a ausência de reatividade glial são igualmente deletérios.

Por outro lado, o fato de o BBG induzir essa grande remodelação estrutural, mesmo em cérebros não lesionados, convida a uma reflexão crítica. Embora revele a impressionante sensibilidade do tônus purinérgico para a arquitetura glial, também sugere que a inibição prolongada do P2X7R pode interferir em funções homeostáticas finas dos astrócitos (Ahn *et al.* 2023). O P2X7R está envolvido na regulação do cálcio intracelular, na liberação de gliotransmissores como ATP, glutamato e D-serina, e na manutenção da vigilância perissináptica (Monif *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2021). Portanto, uma morfologia hipercomplexa observada após o uso de BBG em cérebros não lesados pode não corresponder a um estado funcionalmente desejável. Ao contrário, pode representar um desbalanço compensatório silencioso, com consequências ainda pouco compreendidas sobre o processamento sináptico e o metabolismo local (Zhang *et al.* 2021). A plasticidade, nesse caso, pode esconder uma disfunção.

Esse contexto se torna ainda mais interessante quando a resposta microglial é inserida no panorama. A avaliação da densidade óptica de Iba-1 que revelou uma ativação robusta da micróglia no grupo STZ, compatível com achados clássicos de neuroinflamação crônica em modelos que mimetizam aspectos da DA esporádica (Heneka *et al.* 2015), refletiu a transformação morfológica e funcional da micróglia em uma forma ameboide, com liberação de citocinas pró-inflamatórias e redução da vigilância ramificada. Notavelmente, o BBG foi capaz de preservar parcialmente essa ativação no grupo STZ+BBG, reduzindo a expressão de Iba-1. De forma intrigante, em animais controle, o BBG também provocou leve aumento na expressão de Iba-1, o que reforça a ideia de que o tônus purinérgico também participa da regulação basal da vigilância microglial.

Quando os achados relacionados a astrócitos e micróglia são considerados de forma integrada, emerge a noção de que a glia participa ativamente da adaptação do tecido nervoso frente ao insulto, atuando como um sistema dinâmico de monitoramento e resposta. A administração de STZ esteve associada a um estado glial reativo, caracterizado por alterações morfológicas em astrócitos e aumento da reatividade microglial, compondo um perfil inflamatório compatível com o observado na região CA1 hipocampal em contextos de neurodegeneração (Misra *et al.* 2016). A intervenção com BBG, por sua vez, esteve associada a modificações nesse perfil, incluindo a atenuação da astrogliose exacerbada e a modulação da expressão de

GFAP e Iba-1, sugerindo uma reorganização parcial da resposta glial, sem implicar reversão completa do estado inflamatório.

Além disso, os efeitos observados do BBG em condições não lesionadas indicam que a sinalização purinérgica, mediada em especial pelo receptor P2X7, pode estar envolvida não apenas em respostas a estímulos inflamatórios, mas também na regulação basal da morfologia e da funcionalidade glial, conforme sugerido por Ahn e colaboradores (2023).

A análise eletrofisiológica revelou que a exposição aguda à STZ não é capaz de comprometer, de forma imediata, os mecanismos clássicos de plasticidade sináptica no hipocampo (Ju *et al.* 2016). Tanto os animais do grupo controle (aCSF) quanto aqueles tratados com STZ apresentaram aumento sustentado na inclinação do fEPSP após a estimulação tetânica de alta frequência (HFS), indicando que a indução da LTP, considerada um marcador funcional da integridade sináptica, permaneceu preservada (Figura 19A) (Biessels *et al.* 1996; Ju *et al.* 2016). Esse resultado é particularmente relevante, pois sugere que os efeitos deletérios atribuídos à STZ não se manifestam diretamente sobre os circuitos neuronais de forma imediata, mas dependem do acúmulo de processos inflamatórios e metabólicos mais duradouros para comprometer a função sináptica, o que corrobora estudos anterior que já indicaram que os prejuízos cognitivos e moleculares associados ao modelo STZ emergem com maior intensidade após exposições repetidas ou crônicas, após a instalação de uma neuroinflamação sustentada no tecido neural (Qi *et al.* 2020; Santos *et al.* 2022).

A análise da curva input-output (I/O) reforça essa interpretação, ao mostrar que a progressão da resposta sináptica frente ao aumento da intensidade do estímulo permaneceu semelhante entre os grupos (Figura 19B). Ainda que uma leve tendência de redução na excitabilidade basal tenha sido observada no grupo STZ, essa diferença não alcançou significância estatística. Contudo, mesmo alterações discretas na excitabilidade podem ser indicativas de uma instabilidade funcional inicial, marcando o início de um estado pró-patológico ainda compensado (Ansari *et al.* 2023). Em modelos de neurodegeneração precoce, essas alterações são frequentemente relatadas como sinais subclínicos que antecedem a falência plástica mais evidente

(Cunha, 2016). Assim, mesmo na ausência de déficits formais, o sistema já opera sob tensão fisiológica.

O achado mais curioso, no entanto, emergiu durante a aplicação direta da STZ no registro basal (Figura 19C), em que a resposta sináptica aumentou de forma abrupta e transitória, com elevação significativa da inclinação do fEPSP, retornando aos níveis anteriores após cerca de 30 minutos. Esse padrão não corresponde a uma LTP genuína, pois carece de estabilidade e manutenção (Ju *et al.* 2016), mas tampouco deve ser descartado como artefato; ao contrário, essa resposta aguda e reversível sugere uma modulação não convencional da sinapse, possivelmente envolvendo a participação da glia.

Astrócitos e micróglia são altamente sensíveis a variações no equilíbrio extracelular e podem influenciar, em escalas temporais rápidas, a excitabilidade sináptica por meio da liberação de mediadores químicos, como gliotransmissores, interleucinas e ATP. O receptor purinérgico P2X7, altamente expresso em ambos os tipos celulares, ganha destaque nesse contexto, uma vez que sua ativação por ATP extracelular em concentrações elevadas pode induzir a liberação de IL-1 β , TNF- α ou até mesmo glutamato, todos capazes de modificar temporariamente a transmissão sináptica (Rodríguez-Gomez *et al.* 2020). Dessa forma, a STZ, ao ser administrada diretamente na região CA1, poderia desencadear uma ativação glial aguda via P2X7, culminando numa liberação rápida de moduladores que aumentam, ainda que por curto período, a resposta sináptica.

Essa hipótese encontra suporte em estudos recentes mostrando que a inibição farmacológica do receptor P2X7 com antagonistas como o BBG é capaz de prevenir alterações cognitivas e sinápticas em modelos experimentais de neuroinflamação exacerbada (Godoy *et al.* 2019; Francistiová *et al.* 2020). Além disso, o trabalho de Ansari e colaboradores (2023) demonstrou que os efeitos comportamentais e bioquímicos duradouros do STZ se manifestam apenas após a instalação de um ambiente inflamatório sustentado, associado à ativação microglial progressiva. Portanto, o padrão observado neste experimento, ausência de disfunção plástica clássica, manutenção da excitabilidade basal e uma resposta aumentada transitória após exposição aguda à STZ, reforça a ideia de que o composto, por si só, não é suficiente para gerar neurodegeneração imediata. Em vez disso, a presença e

ativação da glia parecem ser elementos centrais para a conversão de um insulto agudo em um quadro de disfunção duradoura. Esse entendimento oferece implicações relevantes: ao identificar uma janela inicial em que a resposta glial ainda é moduladora e reversível, abre-se espaço para intervenções terapêuticas que visem bloquear a progressão para estados inflamatórios crônicos. Nessa lógica, a glia deixa de ser apenas uma coadjuvante da lesão e passa a ser vista como agente ativo na mediação da disfunção sináptica.

Em conjunto, os dados aqui discutidos constroem uma linha de raciocínio que se inicia com a instalação de um estado neuroinflamatório precoce, induzido pela administração i.c.v de STZ, e que se desdobra em manifestações bioquímicas, gliais e comportamentais interdependentes. Mesmo na ausência de déficits sinápticos evidentes nos registros eletrofisiológicos, a convergência de alterações em domínios comportamentais sensíveis (como memória e emocionalidade), associada à ativação de astrócitos e micróglias, bem como ao acúmulo de marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo no hipocampo, revela um cérebro funcionalmente comprometido. Essa dissociação entre integridade sináptica basal e prejuízo comportamental precoce destaca a complexidade do processo neurodegenerativo, no qual a disfunção não emerge abruptamente, mas se infiltra por vias sutis, como o desequilíbrio glial e o ambiente redox alterado.

Nesse contexto, o BBG demonstrou ser capaz de modular pontos estratégicos dessa cascata: reduziu marcadores de dano oxidativo, estabilizou a produção de NO, normalizou aspectos do comportamento emocional e evitou o prejuízo da memória aversiva recente. Esses efeitos, mais do que simplesmente protetores, sugerem um reposicionamento funcional do P2X7R como elo entre inflamação e cognição, evidenciando um receptor que, ao ser bloqueado, permite não apenas o controle da resposta inflamatória, mas também a preservação de funções críticas para a adaptação e sobrevivência do organismo. Assim, a presente discussão sustenta que a atuação precoce sobre vias purinérgicas pode ser uma estratégia promissora para conter os primeiros desdobramentos patológicos da DA esporádica, especialmente em estágios em que as sinapses ainda resistem, mas o cérebro já denuncia, em múltiplos níveis, seu declínio.

7 CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar, de forma integrada, os efeitos estruturais, funcionais e inflamatórios do modelo de neurodegeneração induzido por i.c.v de STZ no hipocampo e avaliar o potencial neuroprotetor da inibição do receptor purinérgico P2X7. Combinando abordagens comportamentais, bioquímicas, histoquímicas, morfológicas tridimensionais e eletrofisiológicas, este trabalho traçou um panorama abrangente e preciso da glia como protagonista da disfunção sináptica em contextos neurodegenerativos.

Os resultados demonstraram que a administração do i.c.v de STZ induz alterações na morfologia de astrócitos e micróglia, mesmo em fases iniciais e antes do aparecimento de déficits plásticos duradouros. A glia, nesses casos, não apenas responde passivamente ao insulto, mas parece iniciar uma adaptação dinâmica que remodela o tecido e a rede sináptica. Observou-se uma hipertrofia astrocitária pronunciada, com expansão dos domínios morfológicos e complexificação da arborização, além de uma ativação microglial compatível com estados inflamatórios crônicos. Essas alterações celulares coincidiram com alterações comportamentais nos testes de memória e aprendizado, revelando o impacto funcional precoce dessa neuroinflamação glial. Paralelamente, os dados bioquímicos mostraram aumento de marcadores de estresse oxidativo, reforçando o papel central da inflamação como eixo da patogênese.

No entanto, é a inibição farmacológica do P2X7R que emerge como o elemento mais informativo desta investigação. A modulação desse receptor foi capaz de reverter, de maneira seletiva, alterações estruturais da glia, preservar o desempenho cognitivo e favorecer a manutenção da homeostase sináptica, indicando que o P2X7R exerce um papel central na integração entre alterações celulares e funcionais no cérebro. De forma particularmente relevante, a interferência na sinalização do P2X7 também impactou a organização morfoestrutural da glia em cérebros não lesionados, sugerindo que esse receptor atua como um regulador da arquitetura glial não apenas em condições patológicas, mas também em estados fisiológicos. Em conjunto, esses achados reforçam a ideia de que a sinalização purinérgica, mediada pelo P2X7R, responde de forma sensível às condições do

microambiente cerebral, revelando um nível de controle glial mais dinâmico e refinado do que tradicionalmente reconhecido.

O impacto deste trabalho vai além de sua contribuição descritiva. Ele propõe uma mudança de paradigma: que a neurodegeneração, como observada na DA esporádica, não emerge exclusivamente da perda neuronal progressiva, mas sim de uma falha na regulação glial, uma falha que é, ao menos em fases iniciais, potencialmente reversível. O mapeamento preciso desta “janela de reversibilidade”, em que a glia ainda detém a capacidade de modular sua resposta, representa uma oportunidade estratégica para intervenções terapêuticas precoces e direcionadas.

Por fim, os achados apresentados não apenas lançam luz sobre a glia como eixo primário da degeneração sináptica, mas posicionam o receptor P2X7 como um alvo terapêutico promissor e com potencial translacional. Esta tese não é apenas mais um relato experimental: ela propõe um novo olhar sobre a glia, uma nova forma de entender o início da DA, e um novo caminho terapêutico que pode ser explorado em ensaios futuros. O cérebro, em sua complexidade, pode falhar a partir da glia - e talvez, a partir dela também, possa começar a se curar.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL**, I.; **JHA**, S.; **KUMAR**, A.; **DATUSALIA**, A. K.; **SHARMA**, S. S. Streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative stress: a model for sporadic Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, New York, v. 58, n. 3, p. 1975-1992, 2021.
- AHN**, Y. H.; **TANG**, Y.; **ILLES**, P. The neuroinflammatory astrocytic P2X7 receptor: Alzheimer's disease, ischemic brain injury, and epileptic state. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Londres, v. 27, n. 9, p. 763 -778, 2023.
- ALIBERTI**, M. J. R.; **AVELINO-SILVA**, T. J.; **SUEMOTO**, C. K. Maximizing early dementia detection through Medicare annual wellness visits. *JAMA Network Open*, v. 7, n. 10, e2437162-e2437162, 2024.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION**. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, v. 13(4), p. 325-373, 2017.
- ANDERSON**, M. A.; **AO**, Y.; **SOFRONIEW**, M. V. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters*, Amsterdam, v. 565, p. 23–29, 2014.
- ANDREJEW**, R.; **OLIVEIRA-GIACOMELLI**, Á.; **RIBEIRO**, D. E.; **GLASER**, T.; **ARNAUD-SAMPAIO**, V. F.; **LAMEU**, C.; **ULRICH**, H. The P2X7 receptor: central hub of brain diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, Lausanne, v. 13, p. 124, 2020
- ANSARI**, M.; **AL-JARALLAH**, A.; **BABIKER**, F. Impaired insulin signaling alters mediators of hippocampal synaptic dynamics/plasticity: a possible mechanism of hyperglycemia-induced cognitive impairment. *Cells*, Basel, v. 12, 2023.
- ANTONY**, D., **SHETH**, P., **SWENSON**, A., **SMOLLER**, C., **MAGUIRE**, K., **GROSSBERG**, G. Recent advances in Alzheimer's disease therapy: clinical trials and literature review of novel enzyme inhibitors targeting amyloid precursor protein. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 26(1), p. 63-73, 2025.
- BAI**, Y.; **ZHANG**, Y.; **HAN**, B.; **YANG**, L.; **CHEN**, X.; **HUANG**, R. The role of oxidative stress in Alzheimer's disease and the potential of natural antioxidants as therapeutic targets. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 609073, 2020.
- BARBOSA**, B.; **RESENDE**, E.; **CASTILHOS**, R.; **BORELLI**, W.; **FROTA**, N.; **BALTHAZAR**, M.; **AMATO**, A.; **SMID**, J.; **BARBOSA**, M.; **COUTINHO**, A.; **DE SOUZA**, L.; **SCHILLING**, L.; **DA SILVA**, M.; **FERNANDES**, G.; **BERTOLUCCI**, P.; **NITRINI**, R.; **ENGELHARDT**, E.; **FORLENZA**, O.; **CARAMELLI**, P.; **BRUCKI**, S.; **STUDART**, A. Use

of anti-amyloid therapies for Alzheimer's disease in Brazil: a position paper from the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. *Dementia & Neuropsychologia*, 18 – e2024C002, 2024.

BEDETTA, M.; PIZZO, P.; LIA, A. The multifaceted role of P2X7R in microglia and astrocytes. *Neurochemical Research*, 50(4), 239, 2025.

BEHL, C. In 2024, the amyloid-cascade-hypothesis still remains a working hypothesis, no less but certainly no more. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 16, p. 1459224, 2024.

BELLAVER, B.; FERRARI-SOUZA, J. P.; UGLIONE DA ROS, L.; CARTER, S. F.; RODRIGUEZ-VIEITEZ, E.; NORDBERG, A.; ZIMMER, E. R. Astrocyte biomarkers in Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, Minneapolis, v. 96, n. 24, p. e2944–e2955, 2021.

BENMAMAR-BADEL, A.; OWENS, T.; WLODARCZYK, A. Protective microglial subset in development, aging, and disease: lessons from transcriptomic studies. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 430, 2020.

BERMEJO-PAREJA, F.; DEL SER, T. Alzheimer Syndrome or Age-Related Dementia -History, Therapy and Prevention. *Journal of Clinical Medicine*, 14 (21): 7752, 2025.

BERTOLA, L.; SUEMOTO, C. K.; ALIBERTI, M. J. R.; GOMES GONÇALVES, N.; PINHO, P. J. D. M. R.; CASTRO-COSTA, E.; et al. Prevalence of dementia and cognitive impairment no dementia in a large and diverse nationally representative sample: the ELSI-Brazil study. *The Journals of Gerontology: Series A*, v. 78, n. 6, p. 1060-1068, 2023.

BHATTACHARYA, A.; BIBER, K. The microglial ATP-gated ion channel P2X7 as a CNS drug target. *Glia*, v. 64, n. 10, p. 1772-1787, 2016.

BIESSELS, G. J.; KAMAL, A.; RAMAKERS, G. M.; URBAN, I. J.; SPRUIJT, B. M.; ERKELENS, D. W.; GISPEN, W. H. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, Alexandria, v. 45, n. 9, p. 1259–1266, 1996.

BILTZ, R. G.; SWANSON, S. P.; DRAIME, N.; DAVIS, A. C.; YIN, W.; GOODMAN, E. J.; GODBOUT, J. P. Antagonism of the brain P2X7 ion channel attenuates repeated social defeat induced microglia reactivity, monocyte recruitment and anxiety-like behavior in male mice. *Brain, behavior, and immunity*, 115, 356-373, 2024.

- BREEZE, B.;** CONNELL, E.; WILEMAN, T.; MULLER, M.; VAUZOUR, D.; PONTIFEX, M. G. Menopause and Alzheimer's disease susceptibility: Exploring the potential mechanisms. *Brain Research*, v. 1844, 149170, 2024.
- BROADHURST, P. L.** Determinants of emotionality in rat: I. Situational factors. *British Journal of Psychology*, v. 48, n. 1, p. 1-12, 1957.
- BRUIJNZEEL, A. W.;** BEHNOOD-ROD, A.; MALPHURS, W.; CHELLIAN, R.; CAUDLE, R. M.; FEBO, M.; NEUBERT, J. K. Oxycodone decreases anxiety-like behavior in the elevated plus-maze test in male and female rats. *Behavioural pharmacology*, 33(6), 418-426, 2022.
- BURNSTOCK, G.** P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signalling*, 12: 59-67, 2016.
- BURNSTOCK, G.** Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature reviews Drug discovery*, v. 7(7), p. 575-590, 2008.
- BURNSTOCK, G.** Purinergic signalling in neurodegeneration. *Neural Regeneration Research*, v. 10, n. 12, p. 1919, 2015.
- BURNSTOCK, G.;** KNIGHT, G. E. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signalling*, v. 14, n. 1, p. 1-18, 2018.
- BUTTERFIELD, D. A.;** HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, London, v. 20, n. 3, p. 148-160, 2019.
- CALIL, V.;** ELLIOTT, E.; BORELLI, W.; BARBOSA, B.; BRAM, J.; DE OLIVEIRA SILVA, F.; et al. Challenges in the diagnosis of dementia: insights from the United Kingdom-Brazil Dementia Workshop. *Dementia & Neuropsychologia*, v. 14, p. 201-208, 2020.
- CARDINALI, C. A. E. F.;** MARTINS, Y. A.; MORAES, R. C. M.; et al. Benfotiamine ameliorates Streptozotocin-induced Alzheimer's disease in rats by modulating neuroinflammation, oxidative stress, and microglia. *Molecular Neurobiology*, 2025.
- CARMO, M. R.;** MENEZES, A. P.; NUNES, A. C.; PLIÁSSOVA, A.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M.; CUNHA, R. A.; CANAS, P. M.; ANDRADE, G. M. The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. *Neuropharmacology*, v. 81, p. 142-152, 2014.

CEGIELSKI, V.; **CHAKRABARTY**, R.; **DING**, S.; **WACKER**, M. J.; **MONAGHAN-NICHOLS**, P.; **CHU**, X. P. Acid-sensing ion channels in glial cells. *Membranes*, v. 12, n. 2, 119, 2022.

CHEN, X.; **HU**, J.; **JIANG**, L.; **XU**, S.; **ZHENG**, B.; **WANG**, C.; **WANG**, Q. Brilliant Blue G improves cognition in an animal model of Alzheimer's disease and inhibits amyloid- β -induced loss of filopodia and dendrite spines in hippocampal neurons. *Neuroscience*, v. 279, p. 94-101, 2014.

CHEN, Y.H.; **LIN**, R.-R.; **TAO**, Q.-Q. The role of P2X7R in neuroinflammation and implications in Alzheimer's disease. *Life Sciences*, v. 285, p. 119187, 2021.

CHIARINI, A.; **GUI**, L.; **VIVIANI**, C.; **ARMATO**, U.; **DAL PRÀ**, I. NLRP3 inflammasome's activation in acute and chronic brain diseases: an update on pathogenetic mechanisms and therapeutic perspectives with respect to other inflammasomes. *Biomedicines*, Basel, v. 11, n. 4, p. 999, 2023.

CHIONG, W.; **TSOU**, A. Y.; **SIMMONS**, Z.; **BONNIE**, R. J.; **RUSSELL**, J. A.; **ETHICS, LAW, AND HUMANITIES COMMITTEE**. Ethical considerations in dementia diagnosis and care: AAN position statement. *Neurology*, v. 97, n. 2, p. 80-89, 2021.

CHRISTIMANN, G.; **ROCHA**, G.; **SATTLER**, J. A. G. Bioactive compounds and dietary patterns in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 104, n. 3, p. 597-610, 2025.

CHUNDU, U.; **THIRIVEEDHI**, S.; **BHATTI**, C.; **MUPPARAJU**, J.; **OTINASHVILI**, N.; **GELISHVILI**, E. A Systematic Review of the Efficacy and Safety of Anti-amyloid Monoclonal Antibodies in Alzheimer's Disease. *Cureus*, 17 (6), 2025.

CIEŚLAK, M.; **WOJTCZAK**, A. Role of purinergic P2X7 receptor in the development and progression of brain diseases. *Journal of Neuroinflammation*, London, v. 15, n. 1, p. 186, 2018.

CIRILLO, C.; **CAPOCCIA**, E.; **IUVONE**, T.; **CUOMO**, R.; **SARNELLI**, G.; **STEARDO**, L.; **ESPOSITO**, G. S100B inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, v. 2015, n. 1, 508342, 2015.

COLONNA, M.; **BUTOVSKY**, O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, v. 35, p. 441-468, 2017.

- CRIMINS**, J. L.; POOLER, A.; POLYDORO, M.; LUEBKE, J. I.; SPIRES-JONES, T. L. The intersection of amyloid beta and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, v. 12, n. 3, p. 757-763, 2013.
- CRYAN**, J. F.; MOWREY, E. H.; LUCKI, I. Behavioral characterization of the novel antidepressant desipramine in the forced swim test. *Neuropsychopharmacology*, London, v. 30, n. 12, p. 2256–2261, 2005.
- CUMMINGS**, J., LEE, G., RITTER, A., SABBAGH, M., ZHONG, K.. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, v. 6(1), p. e12050, 2020.
- CUNHA**, R. A. Approaches and challenges in the treatment of cognitive impairments in Huntington's disease: adenosine A2A receptor—a potential target for therapy? *Journal of Alzheimer's Disease*, Amsterdam, v. 47, p. 1091–1105, 2016.
- CUNHA**, R. A.; RODRIGUES, R. J.; SEBASTIÃO, A. M. Purinergic signaling in neuroglia function and dysfunction. *Brain Research Bulletin*, Amsterdam, v. 160, p. 123-138, 2020.
- DA SILVA**, W.; VIEIRA, É. L.; TEIXEIRA, A. L. Cognitive dysfunction and neuroinflammation in Alzheimer's disease: role of hippocampal signaling pathways. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, v. 132, p. 788-803, 2022.
- DAI**, D. L.; LI, M.; LEE, E. B. Human Alzheimer's disease reactive astrocytes exhibit a loss of homeostatic gene expression. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 11, n. 1, 127, 2023.
- DANTAS**, J. E. F.; et al. Relação fisiopatológica entre o Diabetes Mellitus tipo 2 e o desenvolvimento de Alzheimer: uma revisão integrativa. *Revista Delos: Desenvolvimento Local Sustentável*, v. 10, n. 56, p. 137–155, 2025.
- DAWSON**, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 16, n. 2, p. 33-36, 1995.
- DE NOBLE**, W. J.; SZUHAI, B.; SWINKELS, L. M. Passive avoidance test. In: VAN ZWIETEN, P. A. (org.). *Handbook of Psychopharmacology*. Amsterdam: Elsevier. p. 99–118, 1986.
- DE PAULA**, G. C.; BRUNETTO DE FARIAS, A.; ROVERSI, K.; ANTUNES, G.; OLIVEIRA, J.; et al. Neuroinflammation induced by central administration of amyloid- β

oligomers triggers early and long-term memory impairments. *Neurobiology of Learning and Memory*, Amsterdam, v. 185, p. 107524, 2021.

DE SÁ CAVALCANTI, J. L., Engelhardt, E.. Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica. *Rev Bras Neurol*, v. 48(4), p. 21-29, 2012.

DE STROOPER, B.; KARRAN, E. The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell*, v. 164, n. 4, p. 603–615, 2016.

DENG, Q.; WU, C.; PARKER, E.; LIU, T. C. Y.; DUAN, R.; YANG, L. Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: significance and summary of recent advances. *Aging and Disease*, v. 15, n. 4, p. 1537, 2024.

DI CASTRO, M. A.; VOLTERRA, A. Astrocyte control of the entorhinal cortex-dentate gyrus circuit: relevance to cognitive processing and impairment in pathology. *Glia*, Hoboken, v. 70, n. 8, p. 1536–1553, 2022.

DI VIRGILIO, F.; DAL BEN, D.; SARTI, A. C.; GIULIANI, A. L.; FALZONI, S. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*, v. 47, n. 1, p. 15-31, 2017.

DOMINIK, G., Viktoria, L. G., Andreas, U. M., Reto, W. K., Chandni, P., Alba, M. K., Heike, R.. Acetylcholinesterase inhibitors combined with memantine for moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Swiss Medical Weekly*, v. 149(25-26), p. w20093, 2019.

DRAGIĆ, M.; MITROVIĆ, N.; ADŽIĆ, M.; NEDELJKOVIĆ, N.; GRKOVIĆ, I. Purinergic signaling participates in a transition between functional states of reactive microglia and controls astrocyte-driven neuroinflammation in the model of trimethyltin-induced neurodegeneration. *Research Square*, 1-32, 2020.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, San Diego, v. 186, p. 421–431, 1990.

DUNACKA, J.; ŚWIĄTEK, G.; WRONA, D. High behavioral reactivity to novelty as a susceptibility factor for memory and anxiety disorders in streptozotocin-induced neuroinflammation as a rat model of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 25, n. 21, p. 11562, 2024.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.

ESCARTIN, C.; GALEA, E.; LAKATOS, A.; O'CALLAGHAN, J. P.; PETZOLD, G. C.; SERRANO-POZO, A.; VERKHRATSKY, A. Reactive astrocyte nomenclature,

definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, Londres, v. 24, n. 3, p. 312–325, 2021.

ESMAILI, Z.; SHABANI, M.; KARIMI, F.; RAZAVINASAB, M.; AHMADI-ZEIDABADI, M.; FAROKHI, M. R.; MOOSAVI, M. Quercetin mitigates aluminum nanoparticle-induced neurotoxicity: a stereological and molecular study on memory, hippocampal integrity, and MAPK signaling. *EXCLI Journal*, Frankfurt, v. 24, p. 708–727, 2025.

ETHIRAJ, S.; et al. Neuroprotective mechanisms of metformin in ICV-STZ-induced Alzheimer model: Role of insulin signaling. *Metabolic Brain Disease*, v. 35, n. 6, p. 927–939, 2020.

FAN, M.; WANG, C.; ZHAO, X.; JIANG, Y.; WANG, C. Parthenolide alleviates microglia-mediated neuroinflammation via MAPK/TRIM31/NLRP3 signaling to ameliorate cognitive disorder. *International Immunopharmacology*, v. 120, 110287, 2023.

FAROOQ, R. K.; TANTI, A.; AINOUCHE, S.; ROGER, S.; BELZUNG, C.; CAMUS, V. A P2X7 receptor antagonist reverses behavioural alterations, microglial activation and neuroendocrine dysregulation in an unpredictable chronic mild stress model of depression in mice. *Psychoneuroendocrinology*, Oxford, v. 97, p. 120-130, 2018.

FERRARI-SOUZA, J. P.; BELLAVER, B.; FERREIRA, P. C.; POVALA, G.; LUSSIER, F. Z.; LEFFA, D. T.; et al. Association of reactive astrogliosis and microglial activation with tau pathology in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, v. 19, e078423, 2023.

FERREIRA, A. C.; ALMEIDA, L. P.; CALHEIROS, R.; MONTEIRO, P.; FERREIRA, R.; GOMES, E. D. Microglial activation and neuroinflammation in Alzheimer's disease: implications for therapeutic intervention. *Life Sciences*, Oxford, v. 291, p. 120294, 2022.

FERREIRA, P.; Piai I K., Takayanagu I. A.; Segura M. S. Alumínio como fator de risco para a doença de Alzheimer. *Revista Latino-Americana De Enfermagem*, v. 16(1), p. 151-157, 2008.

FETER, N.; LEITE, J. S. Is Brazil ready for the expected increase in dementia prevalence?. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 37, e00056421, 2021.

FONTELES, A. A.; NEVES, J. C.; MENEZES, A. P. F.; PEREIRA, J. F.; SILVA, A. T.; A.; CUNHA, R. A.; ANDRADE, G. M. ATP signaling controlling dyskinesia through P2X7 receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13: 111, 2020.

FRANCISTIOVÁ, L., Bianchi, C., Di Lauro, C., Sebastián-Serrano, Á., de Diego-García, L., Kobolák, J., Díaz-Hernández, M. The role of P2X7 receptor in Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 13, p. 94, 2020.

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 133, n. 2, p. 118–132, 2006.

FRANKE, H.; VERKHRATSKY, A.; BURNSTOCK, G.; ILLES, P. Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signalling*, v. 8, n. 3, p. 629-657, 2012.

FRISONI, G.; AHO, E.; BRAYNE, C.; CICCARELLI, O.; DUBOIS, B.; FOX, N.; FREDERIKSEN, K.; GABAY, C.; GARIBOTTO, V.; HOFMARCHER, T.; JACK, C.; KIVIPELTO, M.; PETERSEN, R.; RIBALDI, F.; ROWE, C.; WALSH, S.; ZETTERBERG, H.; HANSSON, O. Alzheimer's disease outlook: controversies and future directions. *Lancet*, 406 (10510), 1424-1442. 2025.

GHASEMI, A.; JEDDI, S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: A practical guide. *EXCLI Journal*, v. 22, p. 274, 2023.

GHASEMI-KASMAN, M.; HAJIKARAM, M.; TAHERI, F.; SHAHMORADI, Z.; BAHADORI, M.; et al. Neuroprotective effects of curcumin in a model of Alzheimer's disease induced by intracerebroventricular streptozotocin: involvement of oxidative stress and neuroinflammation. *Metabolic Brain Disease*, New York, v. 36, n. 4, p. 663-673, 2021.

GILDEA, H. K.; LIDDELOW, S. A. Mechanisms of astrocyte aging in reactivity and disease. *Molecular Neurodegeneration*, London, v. 20, n. 1, p. 1–14, 2025.

GODOY, P. A.; RAMÍREZ-MOLINA, O.; FUENTEALBA, J. Exploring the role of P2X receptors in Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, Lausanne, v. 10, p. 1330, 2019.

GOMES, F. V.; LLORENTE, R.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Neuroinflammation in stress and depression: role of purinergic signaling. *Frontiers in Pharmacology*, Lausanne, v. 13, p. 885253, 2022.

GÓMEZ-ISLA, T., Price, J. L., McKeel Jr, D. W., Morris, J. C., Growdon, J. H., Hyman, B. T. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, v. 16(14), p. 4491-4500, 1996.

GONÇALVES, F. Q.; SILVA, A.; LEMOS, C.; PINTO, S.; CUNHA, R. A. P2X7 receptor in neurodegeneration: new insights and therapeutic perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 24, n. 2, p. 1489, 2023.

- GRASSI, F.;** SALINA, G. The P2X7 receptor in autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (18): 14116, 2023.
- GREEN, L. C.;** WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- GRIEB, P.** Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology*, 53 (3). 1741 – 1752, 2015.
- GROTTELLI, S.;** AMOROSO, R.; MACCHIONI, L.; D'ONOFRIO, F.; FETTUCCIARI, K.; BELLEZZA, I.; MACCALLINI, C. Acetamidine-based iNOS inhibitors as molecular tools to counteract inflammation in BV2 microglial cells. *Molecules*, 25(11), 2646, 2020.
- GRÜNBLATT, E.;** SALKOVIC-PETRISIC, M.; OSMANOVIC, J.; RIEDERER, P.; HOYER, S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of Neurochemistry*, v. 101, n. 3, p. 757-770, 2007.
- HALL, C. S.** Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, v. 18, n. 3, p. 385, 1934.
- HAN, C.;** WEI, B.; GUAN, L.; XU, L. *Toxoplasma gondii*-induced brain tissue damage via inhibiting P2X7R/NLRP3 pro-inflammatory and enhancing PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway. *Biology Bulletin*, Springer, 2024.
- HAN, X.;** LI, Y.; WANG, J.; LIU, X.; ZHANG, Y.; DONG, Q.; et al. Associations between lifelong cognitive reserve, Alzheimer's disease-related plasma biomarkers, and cognitive function in dementia-free older adults: A population-based study. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 103, n. 3, p. 821-832, 2025.
- HANEKA, M. T.;** CARSON, M. J.; EL KHOURY, J.; et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.
- HANSEN, R. A.,** Gartlehner, G., Webb, A. P., Morgan, L. C., Moore, C. G., Jonas, D. E. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clinical interventions in aging*, v. 3(2), p. 211-225, 2008.

HASHEMI-FIROUZI, N.; KOMAKI, A.; ASL, S. S.; SHAHIDI, S. The effects of the 5-HT7 receptor on hippocampal long-term potentiation and apoptosis in a rat model of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, v. 135, p. 85-91, 2017.

HENEKA, M. T.; GOLENBOCK, D. T.; LATZ, E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, v. 16, n. 3, p. 229–236, 2015.

HENSTRIDGE, C. M., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L.. Beyond the neuron–cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 20(2), p. 94-108, 2019. **DETURE, M. A.**, Dickson, D. W.. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, v. 14(1), p. 32, 2019.

HONG, S.; BEJA-GLASSER, V. F.; NFONYOIM, B. M.; et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, v. 352, n. 6286, p. 712–716, 2016.

HUANG, Q.; YING, J.; YU, W.; DONG, Y.; XIONG, H.; ZHANG, Y.; HUA, F. P2X7 receptor: an emerging target in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, v. 61, n. 5, p. 2866-2880, 2024.

IGARASHI, K. M. Entorhinal cortex dysfunction in Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 124–136, 2023.

ILLES, P. P2X7 receptors amplify CNS damage in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, p. 5996, 2020.

ILLÉS, P. P2X7 Receptors Amplify CNS Damage in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (17): 5996, 2020.

ILLES, P., RUBINI, P., HUANG, L., TANG, Y. The P2X7 receptor: a new therapeutic target in Alzheimer's disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, v. 23(3), p. 165-176, 2019.

ILLES, P.; KHAN, T. M.; RUBINI, P. Neuronal P2X7 receptors revisited: Do they really exist? *Trends in Neurosciences*, v. 43, n. 10, p. 714–724, 2020.

ILLES, P.; MÜLLER, C. E.; JACOBSON, K. A.; GRUTTER, T.; NICKE, A.; FOUNTAIN, S. J.; DI VIRGILIO, F. Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *British Journal of Pharmacology*, Londres, v. 178, n. 3, p. 489–514, 2021.

ILLES, P.; RUBINI, P.; ULRICH, H.; ZHAO, Y.; TANG, Y. Regulation of microglial functions by purinergic mechanisms in the healthy and diseased CNS. *Cells*, Basel, v. 9, n. 5, p. 1108, 2020.

IWAMARU, Y.; **TAKENOUCHI**, T.; **MURAYAMA**, Y.; **OKADA**, H.; **IMAMURA**, M.; **SHIMIZU**, Y.; **KITANI**, H. Anti-prion activity of Brilliant Blue G. *PLoS One*, 7(5), e37896, 2012.

JAEGER, B.; **OLIVEIRA**, M.; **CASTILHOS**, R.; **CHAVES**, M. Tertiary center referral delay of patients with dementia in Southern Brazil: associated factors and potential solutions. *Dementia & Neuropsychologia*, v. 15, p. 210-215, 2021.

JOE, E., Ringman, J. M. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention. *Bmj*, v. 367, 2019.

JU, T.; **WANG**, X.; **ZHOU**, S.; **ZHAO**, T.; **YANG**, M.; **LIN**, J.; **SUN**, L.; **LIU**, T.; **XU**, Y.; **ZHANG**, L. Streptozotocin inhibits synaptic transmission and edaravone attenuates streptozotocin-induced electrophysiological changes in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampal slices. *Neurotoxicology*, Oxford, v. 57, p. 75–86, 2016.

KAMAT, P. K.; **KALANI**, A.; **RAI**, S.; **SWARNKAR**, S.; **TOTA**, S.; **NATH**, C.; **TYAGI**, N. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: understanding the therapeutics strategies. *Molecular Neurobiology*, v. 53, n. 1, p. 648-661, 2016.

KESHAVARZ, Z.; **HASSANKHANI**, A.; **YOOSEFIAN**, M. Targeting cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease: Development of next-generation galantamine derivatives. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 23 (3): 100530, 2025.

KHEZRI, S.; **GHASEMI-KASMAN**, M.; **GHOLAMI**, K.; **DEHGHANIAN**, F.; **BAHADORI**, M.; **YOUSEFZADEH-CHABOK**, S. Streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease model in rats: cognitive dysfunction and histological study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Amsterdam, v. 100, p. 101662, 2019.

KNEZOVIC, A.; et al. Streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease: Relevance for glial activation and neuroinflammation. *Journal of Neural Transmission*, v. 122, n. 4, p. 577–592, 2015.

KOFUJI, P.; **ARAQUE**, A. G-protein-coupled receptors in astrocyte–neuron communication. *Neuroscience*, v. 456, p. 71-84, 2021.

KOLAY, A.; **SINGH**, N.; **GUPTA**, P.; **SHAIKH**, A. M.; **GOEL**, R.; **NAGPAL**, D.; **CHITME**, H. Immunotherapies: A Treasure Trove of Alzheimer's Disease. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2025.

KORTE, M.. Neuronal function of Alzheimer's protein. *Science*, v. 363(6423), p. 123-124, 2019.

- LALONDE, R.** The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 26, n. 1, p. 91-104, 2002.
- LANTÉ, F.; MEUNIER, J.; AUBERT, I. et al.** Subchronic administration of lipopolysaccharide in rats induces astroglial activation and alters both glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, Oxford, v. 99, n. 3, p. 539–551, 2006.
- LENG, F.; EDISON, P.** Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, v. 17, n. 3, p. 157–172, 2021.
- LI, D.; HUANG, Y.; CHENG, B.; SU, J.; ZHOU, W. X.; ZHANG, Y. X.** Streptozotocin induces mild cognitive impairment at appropriate doses in mice as determined by long-term potentiation and the Morris water maze. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 54, n. 1, p. 89-98, 2016.
- LI, X.; FENG, X.; SUN, X.; HOU, N.; HAN, F.; LIU, Y.** Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 14, 937486, 2022.
- LIDDELOW, S. A.; GUTTENPLAN, K. A.; CLARKE, L. E.; et al.** Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, London, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.
- LINDEMANN, C.; LANG, U. E.** Pathways connecting late-life depression and dementia. *Frontiers in Pharmacology*, 11: 279, 2020.
- LIU, X., Li, Y., Huang, L., Kuang, Y., Wu, X., Ma, X., Lan, J.** Unlocking the therapeutic potential of P2X7 receptor: a comprehensive review of its role in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Pharmacology*, v. 15, p. 1450704, 2024.
- LOBO, P. B.; PEREZ-NIEVAS, B. G.; NOBLE, W.** Investigating P2X7R-mediated inflammatory signalling in Alzheimer's disease: Developing topics. *Alzheimer's & Dementia*, v. 16, p. e047122, 2020.
- LOCKHART, I. A., Mitchell, S. A., Kelly, S..** Safety and tolerability of donepezil, rivastigmine and galantamine for patients with Alzheimer's disease: systematic review of the 'real-world' evidence. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, v. 28(5), p. 478-492, 2009.

MANCINELLI, R.; FRATI, A.; SANTORO, A.; POLIDORO, M.; PUGLIESE, G.; et al. P2X7 receptor in neurological disorders: insight into novel therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 22, n. 21, p. 11618, 2021.

MARTIN, E.; AMAR, M.; DALLE, C.; YOUSSEF, I.; BOUCHER, C.; LE DUIGOU, C.; DELARASSE, C. New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecular Psychiatry*, v. 24, n. 1, p. 108-125, 2019.

MASCHIO, C. A.; WANG, J.; MAHESHWARI, U.; KELLER, A.; ROMINGER, A.; KONIETZKO, U.; NI, R. Hippocampal purinergic P2X7 receptor level is increased in Alzheimer's disease patients, and associated with amyloid and tau pathologies. *bioRxiv*, 2024.

MENG, X.; ZHANG, H.; ZHAO, Z.; LI, S.; ZHANG, X.; GUO, R.; et al. Type 3 diabetes and metabolic reprogramming of brain neurons: causes and therapeutic strategies. *Molecular Medicine*, v. 31, n. 1, 61, 2025.

MERIGHI, S.; POLONI, T. E.; TERRAZZAN, A.; MORETTI, E.; GESSI, S.; FERRARI, D. Alzheimer and purinergic signaling: Just a matter of inflammation?. *Cells*, v. 10, n. 5, p. 1267, 2021.

MISHRA, A.; GORDON, G. R.; MACVICAR, B. A.; NEWMAN, E. A. Astrocyte regulation of cerebral blood flow in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 4, a041354, 2024.

MISRA, S.; CHOPRA, K.; SAIKIA, U. N.; SINHA, V. R.; SEHGAL, R.; MODI, M.; MEDHI, B. Effect of mesenchymal stem cells and galantamine nanoparticles in rat model of Alzheimer's disease. *Regenerative Medicine*, Londres, v. 11, n. 7, p. 629–646, 2016.

MONFARED, T. A. A.; BYRNES, M. J.; WHITE, L. A.; ZHANG, Q. Alzheimer's disease: epidemiology and clinical progression. *Neurology and Therapy*, v. 11, n. 2, p. 553-569, 2022.

MONIF, M.; BURNSTOCK, G.; WILLIAMS, D. A. Microglia: agents of the CNS pro-inflammatory response. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 1–5, 2010.

MOREIRA, P. I.; et al. Insulin resistance and mitochondrial dysfunction: new insights into Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 17, n. 3, p. 575–590, 2009.

MOREIRA-SILVA, D.; BITTENCOURT, L.; RAMOS, D. B.; LEFFA, D. T.; PREDIGER, R. D. Neuroimmune targets in the preclinical study of neuropsychiatric symptoms in

Alzheimer's disease models: focus on cognitive and emotional behavior. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 226, p. 109365, 2023.

MORRISSEY, M. V.; COAKLEY, A. L. Alzheimer's disease: beyond the medical model. *Quay Books*, 1999.

MUNHOZ, C. D.; LEPSCH, L. B.; KAWAMOTO, E. M.; MALTA, M. B.; LIMA, L. S.; AVELLAR, M. C.; et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor- κ B in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *Journal of Neuroscience Research*, Hoboken, v. 98, n. 5, p. 911-924, 2020.

MUÑOZ DE LEÓN-LÓPEZ, C. A.; NAVARRO-LOBATO, I.; KHAN, Z. U. The role of astrocytes in synaptic dysfunction and memory deficits in Alzheimer's disease. *Biomolecules*, Basel, v. 15, n. 7, p. 910, 2025.

NAFFAA, M. M. Mechanisms of astrocytic and microglial purinergic signaling in homeostatic regulation and implications for neurological disease. *Exploration of Neuroscience*, v. 4, p. 100676, 2025.

NAGAYACH, A.; PATRO, N.; PATRO, I. Astrocytic and microglial response in experimentally induced diabetic rat brain. *Metabolic Brain Disease*, v. 29, n. 3, p. 747–762, 2014.

NAGHIZADEH, B.; MANSOURI, M. T.; GHORBANZADEH, B.; FARBOOD, Y.; SARKAKI, A. Protective effects of oral crocin against intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory deficit and oxidative stress in rats. *Phytomedicine*, v. 20, n. 6, p. 537-542, 2013.

NANDI, A., COUNTS, N., CHEN, S., SELIGMAN, B., TORTORICE, D., VIGO, D., BLOOM, D. E. Global and regional projections of the economic burden of Alzheimer's disease and related dementias from 2019 to 2050: a value of statistical life approach. *EClinicalMedicine*, v. 51, 2022.

NANDIPATI, K. C.; SUBRAMANIAN, S.; AGRAWAL, D. K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 426, n. 1, p. 27-45, 2017.

NICHOLS, E.; STEINMETZ, J. D.; VOLLSET, S. E.; FUKUTAKI, K.; CHALEK, J.; ABD-ALLAH, F.; et al. 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*, v. 7, n. 2, p. e105-e125, 2022.

OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á.; NAALDIJK, Y.; BALK, S.; WENK, G. L.; SANT'ANNA, M. B. Purinergic receptors in neuroimmune interactions in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, Lausanne, v. 13, p. 650747, 2021.

OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á.; PETIZ, L. L.; ANDREJEV, R.; et al. Role of P2X7 Receptors in Immune Responses During Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Lausanne, v. 15, p. 662935, 2021.

OMS, Organização Mundial da Saúde (Global dementia status report / WHO Dementia Infographic): WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global dementia status and projections. Geneva: WHO; 2021.

PAGNON DE LA VEGA, M., GIEDRAITIS, V., MICHNO, W., KILANDER, L., GÜNER, G., ZIELINSKI, M., INGELSSON, M.. The Uppsala APP deletion causes early onset autosomal dominant Alzheimer's disease by altering APP processing and increasing amyloid β fibril formation. *Science translational medicine*, v. 13(606), p. eabc6184, 2021.

PARK, S.; PARK, M.; KIM, E.; KIM, J.; HUH, Y.; CHO, J. Distinct disruptions in CA1 and CA3 place cell function in Alzheimer's disease mice. *iScience*, v. 28, 2024.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates: compact. 2004.

PÉREZ-CATALÁN, N. A.; DOE, C. Q.; ACKERMAN, S. D. The role of astrocyte-mediated plasticity in neural circuit development and function. *Neural Development*, Londres, v. 16, n. 1, p. 1, 2021.

PONCE-LOPEZ, T.; GONZÁLEZ ÁLVAREZ TOSTADO, J. A.; DIAS, F.; MONTIEL MALTEZ, K. H. Metformin prevents NDEA-induced memory impairments associated with attenuating beta-amyloid, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 levels in the hippocampus of rats. *Biomolecules*, v. 13, n. 9, p. 1289, 2023.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, Paris, v. 229, n. 2, p. 327–336, 1977.

PREETI, K.; SOOD, A.; FERNANDES, V. Metabolic regulation of glia and their neuroinflammatory role in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 42, n. 8, p. 2527-2551, 2022.

QI, C.; CHEN, X.; GAO, X.; XU, J.; LIU, S.; GE, J. Impaired learning and memory ability induced by a bilaterally hippocampal injection of streptozotocin in mice: involved with

the adaptive changes of synaptic plasticity. *Frontiers in Aging Neuroscience*, Lausanne, v. 13, 2020.

RAI, S.; KAMAT, P. K.; NATH, C.; SHUKLA, R. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 117, p. 104-117, 2014.

RAJMOHAN, R.; REDDY, P. H. Amyloid-beta and phosphorylated tau accumulations cause abnormalities at synapses of Alzheimer's disease neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 57, n. 4, p. 975-999, 2017.

RAMAKRISHNAN, A.; PIEHL, N.; SIMONTON, B.; PARIKH, M.; ZHANG, Z.; TEREKULOVA, V.; et al. Epigenetic dysregulation in Alzheimer's disease peripheral immunity. *Neuron*, v. 112, n. 8, p. 1235-1248, 2024.

RAZA, A., SALEEM, S., IMRAN, S., RAHMAN, S., HAROON, M., RAZZAQ, A., HUSSAIN, A., IQBAL, J., SATHIAN, B. From metabolic dysregulation to neurodegenerative pathology: the role of hyperglycemia, oxidative stress, and blood-brain barrier breakdown in T2D-driven Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 40 (7): 276, 2025.

RIBEIRO, D. E.; RONCALHO, A. L.; GLASER, T.; ULRICH, H.; WEGENER, G.; JOCA, S. P2X7 receptor signaling in stress and depression. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 20, n. 11, p. 2778, 2019.

RODA, A. R.; SERRA-MIR, G.; MONTOLIU-GAYA, L.; TIESSLER, L.; VILLEGAS, S. Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, v. 17, n. 8, p. 1666-1674, 2022.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, J. A.; KAVANAGH, E.; ENGSKOG-VLACHOS, P.; ENGSKOG, M. K.; HERRERA, A. J.; ESPINOSA-OLIVA, A. M.; ... BURGUILLOS, M. A. Microglia: agents of the CNS pro-inflammatory response. *Cells*, Basel, v. 9, n. 7, p. 1717, 2020.

ROE, C.; MINTUN, M.; D'ANGELO, G.; XIONG, C.; GRANT, E.; MORRIS, J. Alzheimer disease and cognitive reserve: variation of education effect with carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B uptake. *Archives of Neurology*, v. 65, n. 11, p. 1467-1471, 2008.

RONNING, K.; DÉCHELLE-MARQUET, P.; CHE, Y.; GUILLONNEAU, X.; SENNLAUB, F.; DELARASSE, C. The P2X7 Receptor, a Multifaceted Receptor in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, 2023.

ROTONDO, J. C.; MAZZIOTTA, C.; LANZILLOTTI, C.; STEFANI, C.; BADIALE, G.; CAMPIONE, G.; TOGNON, M. The role of purinergic P2X7 receptor in inflammation and cancer: novel molecular insights and clinical applications. *Cancers*, Basel, v. 14, n. 5, p. 1116, 2022.

SADIK, K.; WILCOCK, G. The increasing burden of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, v. 17, p. S75-S79, 2003.

SAEEDI, M., MEHRANFAR, F.. Challenges and approaches of drugs such as memantine, donepezil, rivastigmine, and aducanumab in the treatment, control and management of Alzheimer's disease. *Recent patents on biotechnology*, v. 16(2), p. 102-121, 2022.

SAGGU, S., BAI, A., AIDA, M., REHMAN, H., PLESS, A., WARE, D., DEÁK, F., JIAO, K., WANG, Q. Monoamine alterations in Alzheimer's disease and their implications in comorbid neuropsychiatric symptoms. *GeroScience*, 47, 457-482, 2024.

SALKOVIC-PETRIŠIĆ, M.; KNEZOVIĆ, A.; HOYER, S.; RIEDERER, P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease about therapeutic strategies in Alzheimer's research. *Journal of Neural Transmission*, v. 120, n. 3, p. 487–510, 2013.

SALTER, M. W.; STEVENS, B. Microglia emerge as central player in brain disease. *Nature Medicine*, v. 23, n. 9, p. 1018–1027, 2017.

SALVADÓ, G.; MILA-ALOMA, M.; SHEKARI, M.; ASHTON, N. J.; OPERTO, G.; FALCON, C.; et al. Reactive astrogliosis is associated with higher cerebral glucose consumption in the early Alzheimer's continuum. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 49, n. 13, p. 4567-4579, 2022.

SANTOS, L. E.; FERREIRA, S. T. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and brain inflammation in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 136, p. 350–360, 2018.

SARTER, M.; BRUNO, J. P. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Research Reviews*, v. 23, n. 1–2, p. 28–46, 1997.

SAVAGE, J. C.; CARRIER, M.; TREMBLAY, M. È. Morphology of microglia across contexts of health and disease. *Methods in Molecular Biology*, v. 2034, p. 13–26, 2019.

SAVIO, L. E. B.; COUTINHO-SILVA, R. P2X7 receptor signaling in central nervous system diseases. *Neural Regeneration Research*, Beijing, v. 14, n. 12, p. 2072-2077, 2019.

- SAVIO**, L. E.; DE ANDRADE MELLO, P.; DA SILVA, C. G.; COUTINHO-SILVA, R. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: angel or demon? *Frontiers in pharmacology*, 9:52, 2018.
- SCHAFER**, D. P.; LEHRMAN, E. K.; STEVENS, B. The “quad-partite” synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*, v. 61, n. 1, p. 24–36, 2013.
- SCHOLZ**, S. W., COBOS, I.. Genetics and neuropathology of neurodegenerative dementias. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, v. 30(6), p. 1801-1822, 2024.
- SEMYANOV**, A.; VERKHRATSKY, A. Astrocytic processes: From tripartite synapses to the active milieu. *Trends in Neurosciences*, Amsterdam, v. 44, n. 10, p. 781–792, 2021.
- SHAN**, L.; YAPING, L.; YANJUN, C.; PENGWEN, W.; RONG, W.; SHULI, S.; JINZHOU, T. Effects of intracerebroventricular administration of streptozotocin on the expression of PSD-95 and Shank 1 in rats. *Europe PMC*, 2010.
- SHARIF-ASKARI**, F.; RABER, J.; ALZOUBI, K. H. Long COVID and brain inflammation: unravelling mechanisms and potential therapies. *Frontiers in Immunology*, v. 16, 2025.
- SHARMA**, M.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sciences*, v. 68, n. 9, p. 1021-1029, 2001.
- SHEN**, W. B.; ELAHI, M.; WANG, B.; ZHAN, M.; YANG, P.; YANG, P. Oxidative stress kinase activation and impaired insulin receptor signaling precede overt Alzheimer’s disease neuropathology. *Journal of Alzheimer’s Disease*, v. 90, n. 2, p. 841-857, 2022.
- SHOJI**, H.; MIYAKAWA, T. Effects of test experience, closed-arm wall color, and illumination level on behavior and plasma corticosterone response in an elevated plus maze in male C57BL/6J mice: a challenge against conventional interpretation of the test. *Molecular brain*, 14(1), 34, 2021.
- SIDORYK-WĘGRZYNOWICZ**, M.; STRUŻYŃSKA, L. Astroglial and microglial purinergic P2X7 receptor as a major contributor to neuroinflammation during the course of multiple sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 22, n. 16, p. 8404, 2021.

SINGH, Y.; PRASAD, S.; KUMAR, H. A Comprehensive Analysis on Galantamine Based Hybrids for the Management of Alzheimer's Disease. *Chemical Biology & Drug Design*, 104 (5): e70004, 2024.

SKAPER, S. D.; DEBETTO, P.; GIUSTI, P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *The FASEB Journal*, v. 24, n. 2, p. 337–345, 2010.

SKUBA, A.; ZAŁUSKA, K.; ŚWIDNIAK, A.; BISKUP, M.; BARTOSZEK, A.; KOPEĆ, K.; et al. Strategies for Treating Alzheimer's: Current Approaches and Future Perspectives. *Quality in Sport*, v. 41, p. 58829-58829, 2025.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012.

SMIT, T.; DESHAYES, N. A.; BORCHELT, D. R.; KAMPHUIS, W.; MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. Reactive astrocytes as treatment targets in Alzheimer's disease—systematic review of studies using the APPswePS1dE9 mouse model. *Glia*, v. 69, n. 8, p. 1852-1881, 2021.

SONI, S.; LUKHEY, M. S.; THAWKAR, B. S.; CHINTAMANENI, M.; KAUR, G.; JOSHI, H.; TULI, H. S.. A current review on P2X7 receptor antagonist patents in the treatment of neuroinflammatory disorders: A patent review on antagonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 397(7), p. 4643-4656, 2024.

SOUZA, L. C.; JESSE, C. R.; DE GOMES, M. G.; VIANA, C. E.; MATTOS, E.; SILVA, N. C.; BOEIRA, S. P. Intracerebroventricular administration of streptozotocin as an experimental approach to depression: evidence for the involvement of proinflammatory cytokines and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Neurotoxicity Research*, v. 31, n. 4, p. 464-477, 2017.

SRIDHAR, G. R. Acetylcholinesterase inhibitors (galantamine, rivastigmine, and donepezil). *NeuroPsychopharmacotherapy*, p. 2709-2721, 2022.

STERPU, D. Anti-dementia drugs for Alzheimer disease. *PSYCHIATRY AND PSYCHOTHERAPY*, p. 63-66, 2020.

TIAN, C.; REYES, I.; MASURKAR, A. Differential alterations of spatial and nonspatial memory circuits within hippocampal CA1 in 3XTG-AD mice. *Alzheimer's & Dementia*, v. 16, 2020.

TORRES, A. K.; JARA, C.; PARK-KANG, H. S.; POLANCO, C. M.; TAPIA, D.; ALARCÓN, F.; et al. Synaptic mitochondria: an early target of amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 84, n. 4, p. 1391-1414, 2021.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 9, n. 2, p. 203-222, 1985.

VALENZA, M.; FACCHINETTI, R.; MENEGONI, G.; STEARDO, L.; SCUDERI, C. Alternative targets to fight Alzheimer's disease: focus on astrocytes. *Biomolecules*, Basel, v. 11, n. 4, p. 600, 2021.

VILLAR, M. F. Z.; HANOTTE, J. L.; PERALTA, F.; REGGIANI, P. C. Streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: Behavioral effects in female rats. *Alzheimer's & Dementia*, v. 17, p. e051339, 2021.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WANG, R.; REDDY, P. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 57, p. 1041-1048, 2016.

WANG, X.; HU, J.; WANG, T.; ZHANG, Y.; DONG, Y. Microglial P2X7 receptor and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Neurochemical Research*, New York, v. 48, n. 1, p. 56-66, 2023.

WANG, Y.; FU, A. K.; IP, N. Y. IL-33/ST2 signaling regulates synaptic plasticity and homeostasis in the adult hippocampal circuitry. *DNA and Cell Biology*, v. 40, n. 9, p. 1125-1130, 2021.

WEN, Z.; LEI, Z.; ZHAN, L.; XIE, Q.; ZHOU, Y.; et al. P2X7 receptor-mediated NLRP3 inflammasome activation in microglial cells is involved in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, Shannon, v. 746, p. 135660, 2021.

WU, Y.; EISEL, U. L. Microglia-astrocyte communication in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 95, n. 3, p. 785-803, 2023.

XU, Y.; GAO, W.; SUN, Y.; WU, M. New insight on microglia activation in neurodegenerative diseases and therapeutics. *Frontiers in Neuroscience*, Lausanne, v. 17, p. 1308345, 2023.

YU, Y.; CHEN, R.; MAO, K.; DENG, M.; LI, Z. The role of glial cells in synaptic dysfunction: insights into Alzheimer's disease mechanisms. *Aging and Disease*, v. 15, n. 2, p. 459, 2024.

YUSTE, J. E.; **TARRAGON**, E.; **CAMPUZANO**, C. M.; **ROS-BERNAL**, F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 322, 2015.

ZAMANI, J.; **VAHID**, A.; **AVELAR-PEREIRA**, B.; **GOZDAS**, E.; **HOSSEINI**, S. H.; **ALZHEIMER'S DISEASE NEUROIMAGING INITIATIVE**. Mapping amyloid beta predictors of entorhinal tau in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, v. 21, n. 2, e14499, 2025.

ZHANG, B.; **LI**, Y.; **LI**, H.; **SHEN**, X.; **ZHU**, Z. Therapeutic Advances in Targeting the Amyloid- β Pathway for Alzheimer's Disease. *Brain Sciences*, 15 (10): 1101, 2025.

ZHANG, T.; **WANG**, F.; **XU**, L.; **GUAN**, Y.; **WANG**, J.; **CHEN**, Z. The purinergic P2X7 receptor: a promising therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, Amsterdam, v. 186, p. 106609, 2023.

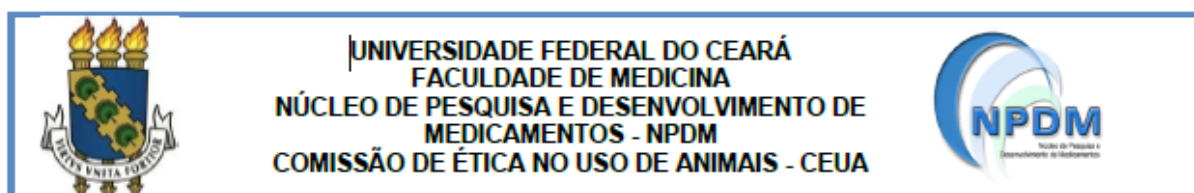
ZHANG, Y.; **CHEN**, K.; **SLOAN**, S. A.; et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, Washington, v. 41, n. 3, p. 479-495, 2021.

ZHAO, L.; **SUN**, L.; **DING**, W.; **ZHANG**, D.; **ZHANG**, C.; et al. Nitrosative stress and neuronal apoptosis in the hippocampus and prefrontal cortex of Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Oxford, v. 81, n. 4, p. 288-298, 2022.

ZHAO, Y. F.; **TANG**, Y.; **ILLES**, P. Astrocytic and oligodendrocytic P2X7 receptors determine neuronal functions in the CNS. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, Lausanne, v. 14, p. 641570, 2021.

ZHENG, W., **YAO**, Z., **LI**, Y., **ZHANG**, Y., **HU**, B., **WU**, D., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Brain connectivity-based prediction of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment based on multi-modal images. *Frontiers in Human Neuroscience*, v. 13, p. 399, 2019.

ANEXO A – CEUA/UFC



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO CORANTE BRILLIANT BLUE G SOBRE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ALZHEIMER INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA"** registrada com o protocolo 33300822-0, sob a responsabilidade **Geanne Matos de Andrade e Ariádne Elisa Belo da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 20 / 10 / 2022.

We hereby certify that the project entitled **"EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF BRILLIANT BLUE G DYE ON SUBMITTED TO THE ANIMAL MODEL OF ALZHEIMER INDUCED BY STREPTOZOTOCIN."** identified by the protocol number 33300822-0, and conducted by **Geanne Matos de Andrade and Ariádne Elisa Belo da Silva** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 10 / 20 / 2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: NOVEMBRO/2022 Fim: NOVEMBRO/2024
Espécie	Camundongo heterogêneo
Linhagem	swiss
Nº de animais autorizados	120
Peso	30-35g
Idade	8 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 20 de outubro de 2022

Documento assinado digitalmente
gov.br LAIS LACERDA BRASIL DE OLIVEIRA
Data: 24/10/2022 13:50:41-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338
Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 9h às 12h e das 13h30 às 18h. E-mail: ceua-npdm@ufc.br