



ANÁLISE MULTIELEMENTAR USANDO TÉCNICAS DE XRF EM CÉREBROS
DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS UTILIZANDO O MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDA POR OLIGÔMEROS β -AMILOIDE

Danielle Santos de Almeida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Amanda Santos de Souza

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2019

ANÁLISE MULTIELEMENTAR USANDO TÉCNICAS DE XRF EM CÉREBROS
DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS UTILIZANDO O MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDA POR OLIGÔMEROS β -AMILOIDE

Danielle Santos de Almeida

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

Prof. Amanda Santos de Souza, D.Sc.

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc.

Prof. Claudio de Carvalho Conti, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2019

Almeida, Danielle Santos de

Análise Multielementar Usando Técnicas de XRF em Cérebros de Camundongos Suíços Utilizando o Modelo Experimental da Doença de Alzheimer Induzida por Oligômeros β -Amiloide / Danielle Santos de Almeida. - Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019

XIX, 142 p.: il.; 29,7 cm

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Tese (Doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 111-138.

1. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (XRF). 2. Análise Multielementar. 3. Doença de Alzheimer. 4. Oligômeros β -amiloide. 5. Cérebros de camundongos Suíços. I. Lopes, Ricardo Tadeu. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

Ao meu esposo amado Thiago Milhomem

Aos meus pais e irmão Diego

Aos meus sobrinhos

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre foi porto seguro nos momentos mais difíceis e decisivos da minha vida. Aos meus pais, por toda força que me fizeram ter sempre, obrigada pelos valores ensinados que vou carregar para todo sempre. Meu irmão, minha ponte entre o passado e o presente e quem sempre vai estar lá por mim no futuro, obrigada pela família linda que temos hoje em dia e por trazer junto com você essa esposa maravilhosa que é a Nenê, amor é isso, é soma e multiplicação, e foi isso que ela e sua família fizeram. Não tem como não agradecer a minha mãe preta, Tia Beth, te amo muito e obrigada pela força, carinho e ombro amigo, você e sua família estarão sempre no meu coração.

Ao meu amigo, namorado e esposo, obrigada por todo amor, paciência, força e carinho ao longo de toda essa jornada, obrigada por ser a minha melhor parte e ser meu parceiro em tudo, obrigada por me acolher em sua família, obrigada a todos os Milhomens por terem me recebido tão bem na família, obrigada a todos pela força e por sempre nos apoiar em nossas decisões. Gabriela, obrigada por apoiar, incentivar e ajudar sempre que precisei, os puxões de orelhas também foram essenciais.

Aos amigos que fiz ao longo dessa jornada e que me apoiaram muitas vezes nos momentos mais difíceis, Larissa, Regina Carla, Ilma e Mônica, meu muito obrigada pois nada disso teria sido possível se não fosse o apoio, compreensão e força de vocês. Obrigada também à família Brigadeiro, que, durante esses quase 8 anos, me apoiaram na graduação, mestrado e, agora, doutorado, vocês fazem parte dessa conquista.

Aos amigos que fiz durante a graduação e levo para a vida, obrigada Júlio pelo ombro amigo e os sacodes quando a única vontade era jogar tudo pro alto. Claudia Diniz, pelos longos papos via trocas de mensagens, sem saber você me fez muitas vezes rir quando a única vontade era chorar. Analu, amiga obrigada pela força que deu corrigindo inglês e que muitas vezes teve palavras de conforto nos momentos que precisei. Carlinha e Felipe, são tantas coisas a agradecer que não dá nem para enumerar então fica mais fácil agradecer a parceria que temos na vida. Karol, amiga que trouxe da graduação para a pós-graduação e para a vida, obrigada pelas horas que bateu o desespero e você me acalmou, me ajudou e, acima de tudo, me deu sua amizade. Obrigada à Glaucia Gouveia, que tão precocemente deixou esse mundo e se fez estrela em nossas vidas, obrigada por ter sido a pessoa mais dócil, mais esperançosa, carinhosa e feliz, são pessoas como você que fazem a nossa vida nesse plano astral ter valido a pena.

Aos amigos do Lieta, que sempre estavam lá com palavras de incentivo e força. Obrigada por aliviarem o peso que carregamos ao ajudar no desenvolvimento da pesquisa, além de garantirem boas risadas. Obrigada Ramon, Raysa, Francis, Hugo, Hamilton, Danilo, Ana Cecilia, Catarine, Roberta e Elicardo.

Ao meu orientador Ricardo Tadeu Lopes, que depositou em mim a confiança de realizar este trabalho em parceria com o Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Técnicas Analíticas (LIETA) e com o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas (LDN) me dando total liberdade durante todo o processo de pesquisa e me apoiando em meu desenvolvimento acadêmico.

À minha orientadora externa Amanda Santos de Souza, que aceitou a parceria para o desenvolvimento deste trabalho permitindo assim que esta tese pudesse ser concebida.

Ao professor Marcelino José dos Anjos, por toda a confiança desde a iniciação científica até o meu ingresso no doutorado, por todo apoio que me deu e dá nestes anos, por acreditar e acima de tudo confiar na minha capacidade, muito obrigada pelos conselhos, broncas e amizade.

Aos amigos do LIN, que garantiram boas risadas e deram força também nos momentos que mais precisei.

Aos funcionários do PEN, que com muito carinho sempre se mostraram dispostos a ajudar e orientar a todos os alunos.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc)

ANÁLISE MULTIELEMENTAR USANDO TÉCNICAS DE XRF EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS UTILIZANDO O MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDA POR OLIGÔMEROS β -AMILOIDE

Danielle Santos de Almeida

Fevereiro/2019

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes
Amanda Santos de Souza

Programa: Engenharia Nuclear

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença progressiva com características patológicas de perda neuronal e sináptica. Tem sido cada vez mais reconhecido que o surgimento da DA está ligado à função e aos níveis de íons metálicos. Assim, estes metais podem interagir com o peptídeo β -amiloide ($A\beta$) resultando na deposição de $A\beta$ e na formação de placas. No entanto, nenhum estudo analisando os efeitos da injeção de oligômeros solúveis de β -amiloide ($A\beta$ Os) na homeostase de elementos em camundongos foi desenvolvido. Neste estudo, a concentração e distribuição de metais no cérebro de camundongos suíços foram avaliadas através das técnicas TXRF e μ SRXRF. Para isto, três grupos de cada sexo foram estudados e, para induzir a DA experimental, os animais receberam injeções icv com 10 pmol de $A\beta$ Os (DA10), 100 pmol de $A\beta$ Os (DA100) e PBS (controle). Os resultados utilizando a técnica de TXRF mostraram diferenças na concentração elementar em algumas regiões do cérebro quando comparou-se os grupos DA10 e DA100 com o grupo controle, tanto nas fêmeas quanto nos machos. Por outro lado, os resultados dos grupos DA100 utilizando a μ SRXRF quando comparados com o grupo controle mostraram redução dos níveis de ferro, cobre e zinco. As alterações encontradas nas duas técnicas sugerem que os $A\beta$ Os atuam rapidamente e diferentemente entre os sexos, antes mesmo da formação de placas amiloides, explicando, possivelmente, os déficits cognitivos independentemente da presença de placas insolúveis. Este estudo ajudou a entender que as alterações na concentração elementar podem ser influenciadas pelo $A\beta$ Os.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D. Sc.).

MULTIELEMENTAL ANALYSIS USING XRF TECHNIQUES OF SWISS MICE
BRAINS USING THE EXPERIMENTAL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE
INDUCED BY THE β -AMYLOID OLIGOMERS

Danielle Santos de Almeida

February/2019

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Amanda Santos de Souza

Department: Nuclear Engineering

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible disorder whose pathological features include neuronal and synaptic loss. The imbalance in the homeostasis of metal ions leads to neuronal death. The metal ions may have an important impact on protein misfolding and the progression of the neurodegenerative process. However, no study analyzing the effects of single injection of β -amyloid soluble oligomers (A β O) in the elements' homeostasis in mice was developed. In this study, in order to evaluate the concentration and distribution of metals in brain of Swiss mice, were used TXRF and μ SRXRF techniques. For this, three groups of both genders were studied and icv injections of 10 pmol of A β O (AD10 group), 100 pmol of A β O (AD100 group) and an equivalent volume of vehicle (control group) were made. The TXRF results showed differences in the elemental concentration in some brain regions between AD groups and control group, in both males and females. On the other hand, using the μ SRXRF to compare the AD groups to the control group it was verified a decrease of iron, copper and zinc levels in the AD100 group. These alterations found with the two techniques suggest that A β O acts quickly, even before the amyloid plaques' formation, explaining cognitive deficits independently of amyloid plaques. This study helps to understand that this modification on elemental concentration can be influenced by A β O.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO	1
---------------------	----------

CAPÍTULO II

II FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
II.1 Sistema Nervoso, Estruturas Cerebrais e suas Funções	5
II.1.1 Tecido Nervoso e Células Nervosas	5
II.1.1.1. Neurônios	5
II.1.2 Estruturas Cerebrais e suas Funções	8
II.1.2.1 Telencéfalo ou Cérebro	9
II.1.2.2 Substância Negra	10
II.1.2.3 Cerebelo	10
II.1.2.4 Diencefalo – Tálamo e Hipotálamo	11
II.1.2.5 Amígdala	11
II.1.2.6 Hipocampo	12
II.1.3 Memória	12
II.1.3.1 Memórias Declarativas	13
II.1.3.2 Memórias Procedurais	13
II.1.3.3 Memória de Curta Duração	14
II.1.3.4 Memória de Longa Duração	14
II.1.4 Cérebro e o Envelhecimento	15
II.1.4.1 Alterações Fisiológicas Macroscópicas do SNC	15
II.1.4.2 Alterações Fisiológicas Microscópicas do SNC	16
II.1.4.3 Radicais Livres e o Envelhecimento	17
II.1.4.4 Estresse Oxidativo	17
II.2 A Doença de Alzheimer (DA)	18
II.2.1 Peptídeo β -amiloide ($A\beta$) e a Cascata Amiloide	19
II.2.2 Hipótese dos Oligômeros de $A\beta$ na Doença de Alzheimer	21
II.3 Estresse Oxidativo na Doença de Alzheimer	23
II.4 Metais e a Doença de Alzheimer	24
II. 4.1 Ferro	25
II. 4.1.1 Ferro e o Envelhecimento	26

II.4.1.2	Ferro e a Doença de Alzheimer	27
II.4.2	Cobre	28
II.4.2.1	Cobre e o Cérebro	28
II.4.2.2	Cobre e a Doenças de Alzheimer	29
II.4.3	Zinco	30
II.4.3.1	Zinco e o Cérebro	31
II.4.3.2	Zinco na Doença de Alzheimer	32
II.5	Técnicas Analíticas e Análise Multielementar	33
II.5.1	Fluorescência de Raios X	33
II.5.2	Raios X Característicos	34
II.5.3	Emissão de Elétron Auger e de Fluorescência de Raios X	38
II.5.4	Razão Salta/Absorção	40
II.5.5	Intensidade Relativa das Linhas de Raios X Característicos	42
II.5.6	Quantificação por Fluorescência de Raios X (XRF)	42
II.5.6.1	A Intensidade da Radiação Fluorescente	43
II.5.7	Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF)	50
II.5.8	Limite de Detecção	52
II.5.9	Microfluorescência de Raios X (μ XRF)	53
II.5.10	Radiação Síncroton	55
CAPÍTULO III		
III	MATERIAIS E METÓDOS	56
III.1	Preparação de Amostras	56
III.1.1	Animais	56
III.1.2	Injeção Intracerebroventricular de A β Os em Camundongos	56
III.1.3	Preparação de Amostras e Padrões	57
III.1.3.1	Preparação de Amostras para a Técnica de TXRF	57
III.1.3.2	Preparação de Amostras para a Técnica de μ XRF	59
III.2	Arranjo Experimental	61
III.2.1	Arranjo Experimental para Técnica de TXRF	61
III.2.2	Arranjo Experimental para Técnica de μ SRXRF	63
III.2.2.1	Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS)	63
III.2.2.2	Arranjo Experimental	64
III. 2.3	Análise Estatística da μ SRXRF	66

CAPÍTULO IV	
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
IV.1 Análise Quantitativa por TXRF	67
IV.1.1 Calibração e Sensibilidade do Sistema de TXRF	67
IV.1.2 Limite de Detecção	68
IV.1.3 Análise Estatística	70
IV.1.4 Resultados da Análise por TXRF	70
IV.1.5 Discussão dos Resultados da Análise por TXRF	98
IV.2 Análise Qualitativa por μSRXRF	102
IV.2.1 Resultados da Análise por μ SRXRF	102
IV.2.2 Discussão dos Resultados da Análise por μ SRXRF	106
CAPÍTULO V	
V CONCLUSÕES	108
CAPÍTULO VI	
VI REFERÊNCIAS	111
ANEXO A	
Tabelas das Concentrações Elementares Obtidas por TXRF	139
ANEXO B	
Artigo Publicado	141
ANEXO C	
Artigo em Revisão	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Neurônio modelo	6
Figura 2.2	Representação da sinapse	7
Figura 2.3	Sistema nervoso central de humanos: a) Vista lateral; b) Corte sagital do encéfalo	8
Figura 2.4	Córtex cerebral e suas funções especializadas	9
Figura 2.5	Evolução da DA macroscopicamente e microscopicamente: a) Cérebro sadio; b) Cérebro acometido pela doença exibindo considerável alargamento dos sulcos e estreitamento dos giros, além de notável atrofia em comparação ao cérebro sadio, corte coronal revelando o aumento do volume ventricular e a perda de massa cerebral; c) Emaranhados neurofibrilares (intracelulares) corados por prata; d) Placas senis (extracelulares) coradas por prata	19
Figura 2.6	Na superfície celular, clivagem da proteína precursora amiloide (APP). No processo, a APP é clivada primeiro pela BACE e, em seguida, pela γ -secretase, levando a secreção do peptídeo tóxico $A\beta$.	20
Figura 2.7	Neurotoxicidade dos oligômeros $A\beta$	22
Figura 2.8	Processo de oligomerização e fibrilação do peptídeo β -amiloide: a) O peptídeo β -amiloide pode sofrer um processo sequencial de agregação, formando oligômeros, protofibrilas e fibrilas solúveis; b) Alternativamente, o β -amiloide pode sofrer um processo de oligomerização independente, formando oligômeros que, embora não evoluam para formação de fibrilas, apresentariam considerável efeito neurotóxicos	23
Figura 2.9	Diagrama de energia com possíveis transições dos elétrons	38
Figura 2.10	Representação esquemática do Efeito Auger	39
Figura 2.11	Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico (Z)	40
Figura 2.12	Representação esquemática da emissão de fluorescência de raios X	43

Figura 2.13	Configuração dos sistemas de fluorescência de raios X por EDXRF e TXRF	51
Figura 2.14	Esquema simplificado da análise por μ XRF	54
Figura 2.15	Representação esquemática da obtenção de imagem por μ XRF.	54
Figura 3.1	Injeção intracerebroventricular (icv)	57
Figura 3.2	Comparação entre o encéfalo humano e o encéfalo do rato	58
Figura 3.3	Regiões do encéfalo humano e do encéfalo do rato	58
Figura 3.4	Preparação de amostra para medidas de TXRF	59
Figura 3.5	Fatiador desenvolvido no Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Técnicas Analíticas (LIETA)	60
Figura 3.6	Fotos mostrando o preparo das fatias: a) Fatiador com o cérebro inteiro e gelo seco nas laterais do fatiador para resfriá-lo e manter o cérebro firme durante a obtenção das fatias; b) Fatias dos cérebros armazenadas nos cassetes com Ultralene®; c) Fatia individual armazenada no Ultralene®; d) Amostras liofilizadas prontas para serem analisadas.	60
Figura 3.7	Representação esquemática de: a) Secção coronal de cérebro de camundongo mostrando a região hipocampal circulada em vermelho; b) Foto de uma fatia em corte coronal liofilizada correspondente ao esquema.	61
Figura 3.8	Arranjo experimental para técnica de TXRF	62
Figura 3.9	Panorâmica do anel no Laboratório Nacional de Luz Síncroton	64
Figura 3.10	Arranjo experimental μ SRXRF	65
Figura 4.1	Curva de sensibilidade relativa (S_{ri}) para a linha K – TXRF	68
Figura 4.2	Curva obtida para o limite de detecção da linha K para as amostras certificadas: NIST – Standard Reference Material 1577b (Fígado Bovino)	69
Figura 4.3	Espectro de fluorescência do córtex temporal de um camundongo suíço	70
Figura 4.4	Concentração de fósforo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos	72
Figura 4.5	Concentração de fósforo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos	72

Figura 4.6	Concentração de fósforo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos	73
Figura 4.7	Concentração de fósforo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos	74
Figura 4.8	Concentração de fósforo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos	74
Figura 4.9	Concentração de fósforo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos	75
Figura 4.10	Concentração de enxofre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos	76
Figura 4.11	Concentração de enxofre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos	76
Figura 4.12	Concentração de enxofre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos	77
Figura 4.13	Concentração de enxofre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos	78
Figura 4.14	Concentração de enxofre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos	78
Figura 4.15	Concentração de enxofre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos	79
Figura 4.16	Concentração de potássio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos	80
Figura 4.17	Concentração de potássio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos	80
Figura 4.18	Concentração de potássio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos	81
Figura 4.19	Concentração de potássio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos	82
Figura 4.20	Concentração de potássio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos	82
Figura 4.21	Concentração de potássio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos	83

Figura 4.22	Concentração de ferro ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos	84
Figura 4.23	Concentração de ferro ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos	84
Figura 4.24	Concentração de ferro ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos	85
Figura 4.25	Concentração de ferro ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos	85
Figura 4.26	Concentração de ferro ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos	86
Figura 4.27	Concentração de ferro ($\mu\text{g.g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos	86
Figura 4.28	Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos	87
Figura 4.29	Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos	88
Figura 4.30	Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos	88
Figura 4.31	Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos	89
Figura 4.32	Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos	89
Figura 4.33	Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos	90
Figura 4.34	Concentração de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos	91
Figura 4.35	Concentração de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos	91
Figura 4.36	Concentração de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos	92
Figura 4.37	Concentração de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos	92

Figura 4.38	Concentração de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos	93
Figura 4.39	Concentração de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos	93
Figura 4.40	Concentração de rubídio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos	94
Figura 4.41	Concentração de rubídio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos	95
Figura 4.42	Concentração de rubídio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos	96
Figura 4.43	Concentração de rubídio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos	96
Figura 4.44	Concentração de rubídio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos	97
Figura 4.45	Concentração de rubídio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos	97
Figura 4.46	Espectro de fluorescência de uma fatia de cérebro de camundongo suíço	103
Figura 4.47	Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do P nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100	104
Figura 4.48	Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do S nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100	105
Figura 4.49	Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do Fe nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100	105
Figura 4.50	Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do Cu nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100	105
Figura 4.51	Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do Zn nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Características do tubo de raios X utilizado na técnica de TXRF	62
Tabela 3.2	Características do detector de raios X utilizado na técnica de TXRF	63
Tabela 3.3	Condições experimentais do arranjo para obtenção dos espectros utilizando a técnica de TXRF	63
Tabela 3.4	Condições experimentais para técnica de μ XRF	65
Tabela 4.1	Concentrações das soluções multielementares utilizadas para o cálculo das sensibilidades relativa do sistema TXRF	67
Tabela 4.2	Comparação entre os resultados experimentais e os valores de referência do material de referência: NIST - Standard Reference Material 1577b (Fígado Bovino)	69
Tabela 4.3	Distribuição elementar nas fatias de cérebro	103
Tabela 4.4	Resultado da comparação entre os grupos com DA e o grupo controle utilizando o teste de Kruskal-Wallis	104
Quadro 2.1	Os níveis e subníveis de energias de K a N	36
Tabela A.1	Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) córtex frontal, córtex temporal e hipocampo dos grupos de camundongos suíços fêmeas do modelo experimental da Doença de Alzheimer	139
Tabela A.2	Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) hipotálamo, cerebelo e substância negra dos grupos de camundongos suíços fêmeas do modelo experimental da Doença de Alzheimer	139
Tabela A.3	Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) córtex frontal, córtex temporal e hipocampo dos grupos de camundongos suíços machos do modelo experimental da Doença de Alzheimer	140
Tabela A.4	Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) hipotálamo, cerebelo e substância negra dos grupos de camundongos suíços machos do modelo experimental da Doença de Alzheimer	140

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

APP	Proteína Precursora Amiloide
Aβ	Peptídeo β -amiloide
AβOs	Oligômeros Solúveis β -amiloide
BACE	β -secretase
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
AIEA	Agência Internacional de Energia Atômica
AXIL	Sistema de Análise Quantitativa de Raios X
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HNO₃	Ácido Nítrico
icv	Injeção Intracerebroventricular
LD	Limite de Detecção
LDN	Laboratório de Doenças Neurodegenerativas
LIETA	Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Técnicas Analíticas
LIN	Laboratório de Instrumentação Nuclear
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncroton
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês National Institute of Standards and Technology)
NMDA	N-metil D-Aspartato
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salino (do inglês Phosphate Buffered Saline)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TXRF	Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

μSRXRF	Microfluorescência de Raios X por Reflexão Total induzida por Radiação Síncroton
XRF	Fluorescência de Raios X

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

Os metais desempenham importantes funções no corpo humano tais como: manter a estrutura celular, regular a expressão gênica e a neurotransmissão. No entanto, níveis elevados de metais podem desencadear diversos eventos prejudiciais dentre eles: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, fragmentação do DNA, estresse do retículo endoplasmático, desregulação da autofagia e ativação do apoptose (ANGELI *et al*, 2014, SEO *et al*, 2013, ZHANG *et al*, 2013). A distribuição e a homeostase dos metais em doenças neurodegenerativas e o seu potencial papel na etiologia da neurodegeneração vêm sendo discutida ao longo dos anos. Recentemente, evidências associando a progressão da doença de Alzheimer (DA) e a mudança na distribuição de metais vêm crescendo (AYTON *et al*, 2013).

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva e clinicamente caracterizada pela incapacidade de formar novas memórias, pelo comprometimento cognitivo grave, e eventual incapacidade na realização de atividades diárias. É uma doença relacionada à idade e sua maior incidência ocorre em pessoas acima de 65 anos (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2013). Embora a base para o surgimento da DA ainda seja desconhecida, existem evidências que apontam uma relação entre neurotoxinas derivadas da associação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) com o desenvolvimento da DA. Na hipótese amiloide, a produção deste tipo de peptídeo é considerada central na patologia da DA. A deposição de $A\beta$ gera as fibrilas das placas amiloides presentes nos cérebros acometidos pela DA. Esta produção é elevada devido a mutações e fatores de risco associados à doença (KLEIN, 2006). Além disto, as características patológicas incluem: emaranhados neurofibrilares, perda sináptica, morte neuronal e ativação de células gliais.

No entanto, a hipótese amiloide diz que os depósitos extracelulares de $A\beta$ são a causa fundamental da DA, mas não explica muitos dos principais aspectos clínicos e patológicos da doença. Estudos têm demonstrado que existe pouca, ou mesmo nenhuma, relação entre o tamanho das placas e a deficiência cognitiva em cérebros com DA (GIANNAKOPOULOS *et al.*, 2003).

A presença de oligômeros solúveis β -amiloide ($A\beta$ Os) em cérebros acometidos pela DA tem sido reconhecida como uma característica adicional no cérebro de pacientes com Alzheimer. As primeiras evidências encontradas indicam níveis elevados de $A\beta$ Os antes mesmo do aparecimento de emaranhados pré-fibrilares de $A\beta$ em pacientes com a

DA (FERREIRA *et al.*, 2015a). O aumento dos níveis de oligômeros solúveis parece ocorrer em regiões cerebrais específicas responsáveis por funções cognitivas que, em pacientes com DA, são em geral bastante prejudicadas (LACOR *et al.*, 2004). Estudos têm proposto que os A β Os são os principais agentes causadores da falha sináptica na DA. A falha sináptica está diretamente relacionada com a perda de memória (FERREIRA *et al.*, 2013). Recentemente, foi demonstrado que uma única injeção cerebral intracerebroventricular (icv) de 10 pmol de A β Os leva ao déficit de memória e a depressão, fornecendo um modelo adequado para investigar mecanismos relacionados à DA (FIGUEIREDO *et al.*, 2013, LOURENÇO *et al.*, 2013, LEDO *et al.*, 2013). Os mecanismos identificados foram a neuroinflamação (elevados níveis de interleucina-1b e fator de necrose tumoral- α), a falha sináptica e deficiência na sinalização cerebral de insulina no hipocampo. A deficiência na sinalização cerebral de insulina tem sido sugerida como um fator contribuinte para o déficit cognitivo em animais e pacientes com DA (BOMFIM *et al.*, 2012).

Em cérebro de idosos saudáveis, quando comparados a cérebros de jovens e adultos saudáveis, íons metálicos, tais como zinco, ferro e cobre, encontram-se elevados. Entretanto, estudos demonstram que a concentração destes íons em pacientes com Alzheimer é 3-7 vezes maior quando comparado a cérebros de pessoas saudáveis. A DA foi relacionada ao acúmulo de íons metálicos no cérebro dando origem a Hipótese Metálica (ZATTA *et al.*, 2009). Esta hipótese é fundamentada em resultados experimentais com portadores da DA e indica que a manutenção da homeostase de metais é importante para a função neuronal. Assim, o acúmulo destes íons pode contribuir para o desenvolvimento da DA (HANE *et al.*, 2014). Existem evidências que associam alterações na homeostase dos íons metálicos à perda cognitiva e morte neuronal. Íons metálicos redox são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - do inglês reactive oxygen species) (UTTARA *et al.*, 2009) o que favorece o estresse oxidativo e a inflamação no cérebro de pacientes com Alzheimer (ESKICI *et al.*, 2012). O estresse oxidativo é um dos primeiros sintomas da DA, surgindo antes mesmo da inflamação do cérebro e da formação de placas A β amiloide (ANSARI *et al.*, 2010). A desregulação da homeostase de íons metálicos também pode induzir o excesso intracelular de íons de cálcio livres (Ca⁺²) o que, eventualmente, leva a morte celular apoptótica ou necrótica (MUNDY *et al.*, 2000). Diversos estudos têm sido realizados sobre os efeitos dos metais na agregação de A β e todos eles mostraram que tanto Cu como Zn aceleram a agregação da proteína A β ao longo de diversas vias (VILES, 2012, FALLER *et al.*, 2013). No cérebro de pacientes

com DA, o acúmulo de Fe contribui para a agregação aberrante e toxicidade da proteína A β , uma característica da DA (BANERJEE *et al.*, 2014). Os íons mencionados anteriormente podem desempenhar um papel importante no envelhecimento de proteínas e no progresso do processo neurodegenerativo. Desta maneira, a hipótese amiloide tem sido relacionada a hipótese metálica.

No entanto, não se sabe se o A β O_s tem participação na homeostase cerebral de elementos ou até mesmo na distribuição elementar em diferentes regiões do cérebro, principalmente nas regiões responsáveis pelo aprendizado e memória.

Atualmente existem diversas técnicas bem estabelecidas para determinação da concentração de elementos traço em tecidos humanos tais como Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) (KREBS *et al.*, 2014) e Análise por Ativação de Nêutrons (INAA) (ZAINCHICK *et al.*, 2016). Entretanto, as preparações de amostras nestas técnicas geralmente são caras e as análises demoradas, o que acaba limitando a utilização destas técnicas. Por outro lado, a Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) é uma técnica analítica poderosa e relativamente simples que pode ser utilizada para identificar e quantificar elementos traços. Esta técnica tem alta sensibilidade, ou seja, necessita de pequenas quantidades de amostras da ordem de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, (LOPES *et al.*, 2011, KLOCKENKAMPER *et al.*, 2015) sendo capaz de detectar simultaneamente diversos elementos presentes na amostra em baixas concentrações, e tem sido amplamente aplicada em pesquisas médicas (KLOCKENKAMPER *et al.*, 2015).

O desenvolvimento da técnica de μSRXRF proporcionou novas oportunidades para aplicações biomédicas da técnica de Fluorescência de Raios X. A μSRXRF é uma ferramenta para análise da distribuição elementar de vários tipos de amostras. Uma vantagem importante desta técnica é o fato do feixe primário poder ser focado em um tamanho muito pequeno, o que permite a análise de pequenas estruturas. Uma vez que menos energia é depositada na amostra, são evitados danos térmicos e problemas associados a perda de elementos voláteis. Estas características oferecem uma capacidade de aplicação na análise multielementar não destrutiva simultânea em pequenas amostras tais como: amostras geológicas, ambientais e orgânicas (LANCOSZ *et al.*, 2004). Devido a estas vantagens, as técnicas de TXRF e μSRXRF foram escolhidas para a análise quantitativa elementar e mapeamento multielementar neste trabalho.

O objetivo deste trabalho foi obter a concentração multielementar utilizando a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total e o mapeamento elementar

bidimensional utilizando a técnica de microfluorescência de raios X com radiação Síncrotron em cérebros de camundongos suíços no modelo experimental da DA induzida pelo A β Os.

Objetivos específicos foram:

- ✓ Obter as concentrações dos elementos químicos: fósforo, enxofre, potássio, ferro, cobre, zinco e rubídio, das regiões encefálicas: córtex frontal e temporal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra, de camundongos suíços com a DA experimental;
- ✓ Verificar se há alterações nas concentrações destes elementos nas regiões encefálicas dos grupos DA quando comparados ao grupo controle;
- ✓ Obter os mapas bidimensionais dos elementos: fósforo, enxofre, ferro, cobre e zinco, em fatias do cérebro de animais com a DA experimental;
- ✓ Verificar se há alterações na distribuição global destes elementos nas fatias quando comparadas ao grupo controle;
- ✓ Verificar se há relação entre as alterações observadas na distribuição dos elementos e a concentração de A β Os injetada nos animais estudados;
- ✓ Verificar se há relação entre as alterações observadas na distribuição dos elementos e o sexo dos animais estudados; e
- ✓ Avaliar a influência de duas concentrações diferentes de A β Os, 10 e 100 pmol, injetadas nos animais na distribuição elementar.

CAPITULO II

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

II.1 Sistema Nervoso, Estruturas Cerebrais e suas Funções

O sistema nervoso integra e regula várias atividades do corpo, algumas vezes em localizações distintas (alvos específicos) e algumas vezes de forma mais global. O sistema nervoso em geral atua rapidamente, podendo modular também efeitos do sistema endócrino e imunológico. Anatomicamente, o sistema nervoso se divide em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP).

O sistema nervoso é um grupo de tecidos compostos de células altamente especializadas que possuem características de excitabilidade e condutividade, que recebem o nome de células nervosas. Estas células se interconectam de forma específica e precisa, formando os chamados circuitos neurais. Através destes circuitos, o organismo é capaz de produzir respostas estereotipadas que constituem os comportamentos fixos e invariantes (por exemplo, os reflexos) ou, então, produzir comportamentos variáveis em maior ou menor grau, permitindo que o corpo humano atue com necessária precisão, ou seja, é formado pelos corpos celulares dos neurônios, cuja função é receber, analisar e integrar as informações, a tomada de decisões e envio de ordens (BEAR *et al.*, 2017).

II.1.1 Tecido Nervoso e Células Nervosas

O tecido nervoso compreende basicamente dois tipos celulares: neurônios e as células gliais (neuroglia). O neurônio é a sua unidade fundamental, com a função básica de receber, processar e enviar informações. A neuroglia compreende células que ocupam o espaço entre os neurônios, com funções de sustentação, revestimento ou isolamento, modulação da atividade neuronal e defesa (SILVERTHORN, 2010, BEAR *et al.*, 2017).

II.1.1.1 Neurônios

Neurônios são as células responsáveis pela recepção e transmissão dos estímulos do meio (interno e externo), possibilitando ao organismo a execução de respostas

adequadas para a manutenção da homeostase. São formados por três componentes: corpo celular ou soma, dendritos, e axônio, conforme apresentado na Figura 2.1.

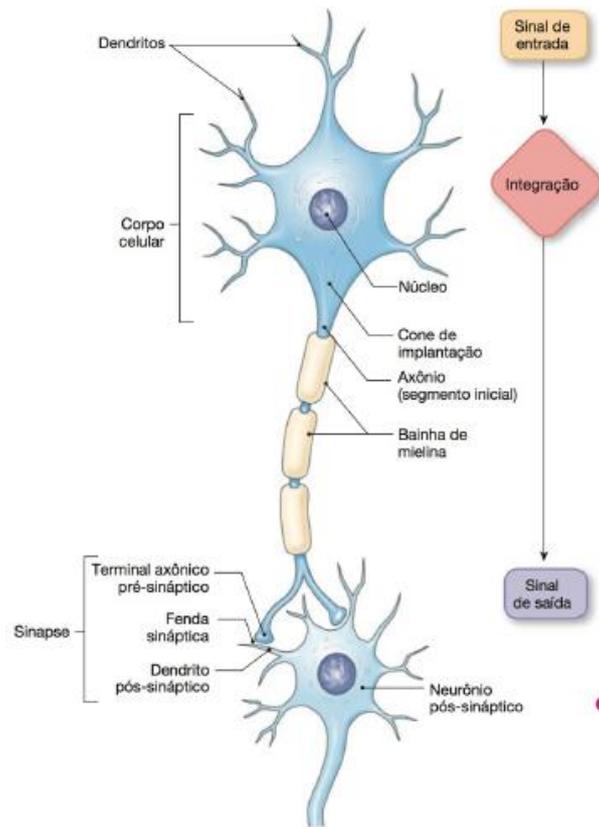


Figura 2.1 - Neurônio modelo (SILVERTHORN, 2010).

Os dendritos são projeções finais do corpo neuronal que se estendem nas áreas circunvizinhas e que recebem o impulso que chega ao neurônio. Este impulso segue, então, por uma extensão única que é o axônio. Este, por sua vez, é capaz de se ramificar em várias terminações. O terminal axonal é o local onde o axônio entra em contato com outros neurônios e/ou outras células e passa a informação, impulso nervoso, para eles. A região de passagem do impulso nervoso de um neurônio para a célula adjacente é chamada de sinapse, Figura 2.2.

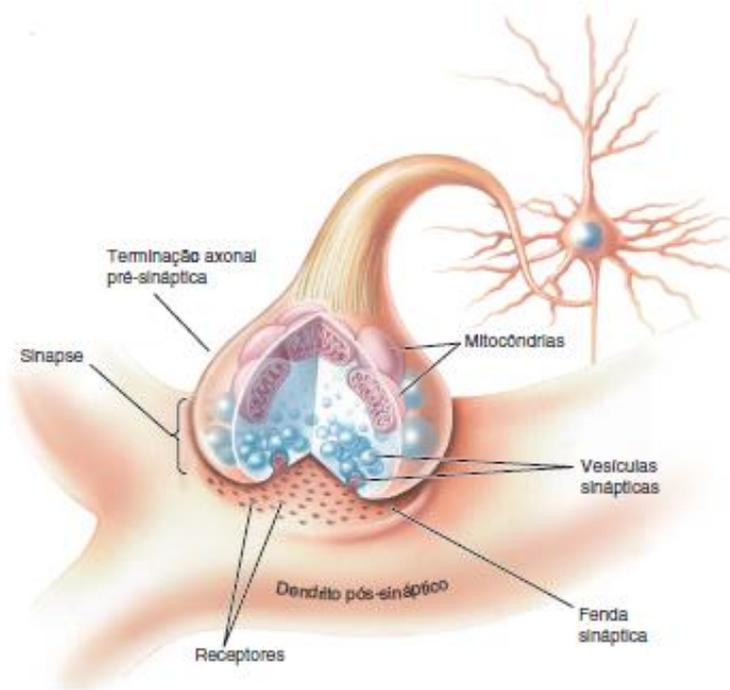


Figura 2.2 - Representação da sinapse (BEAR *et al.*, 2017).

Nas extremidades das fibras nervosas, existem pequenos botões, redondos ou ovais, que constituem os terminais pré-sinápticos. Estes terminais se separam dos dendritos ou do corpo do neurônio pós-sináptico através de um espaço que se chama fenda sináptica. São secretados, nos terminais pré-sinápticos, vesículas que contêm substâncias químicas chamadas de neurotransmissores. Estas substâncias, quando liberadas na fenda sináptica, são capazes de exercer função excitatória ou inibitória sobre o neurônio pós-sináptico de acordo com a natureza de seus receptores. Já foram identificados vários neurotransmissores como a noradrenalina, a acetilcolina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, dentre outros.

Os neurônios podem ser classificados quanto a sua função. Existem os neurônios sensitivos ou aferentes, que recebem informações dos receptores e as levam aos neurônios integradores ou de associação localizados no córtex cerebral, ou seja, levam impulsos da pele ou de outros órgãos sensoriais para o SNC. Existem também os neurônios motores ou eferentes, que levam impulsos para fora do SNC, aos músculos e glândulas. Além destes, existem também os neurônios de associação, que selecionam as informações sensitivas e elaboram a resposta, a qual deve seguir os neurônios motores. A maior parte das informações sensitivas a qual nosso sistema nervoso tem acesso não é utilizada na elaboração de uma resposta. Grande parte das informações restantes é armazenada para,

depois, serem reutilizadas nos processos de pensamento ou de reposta através do processo conhecido como memória. A maior parte deste armazenamento ocorre no córtex cerebral.

II.1.2 Estruturas Cerebrais e suas Funções

O SNC é composto pela medula espinhal e pelo encéfalo, Figura 2.3a, localizados no canal vertebral e no crânio. O encéfalo possui uma forma irregular, cheia de dobraduras e saliências, o que permite reconhecer nele suas diversas subdivisões. As funções e divisões do encéfalo são bastante complexas possibilitando toda a capacidade cognitiva e afetiva dos seres humanos. No encéfalo humano temos o telencéfalo, que corresponde aos hemisférios cerebrais, o diencéfalo, onde encontram-se o tálamo e o hipotálamo, o cerebelo, e o tronco encefálico que é subdividido em mesencéfalo, ponte e bulbo, Figura 2.3b.

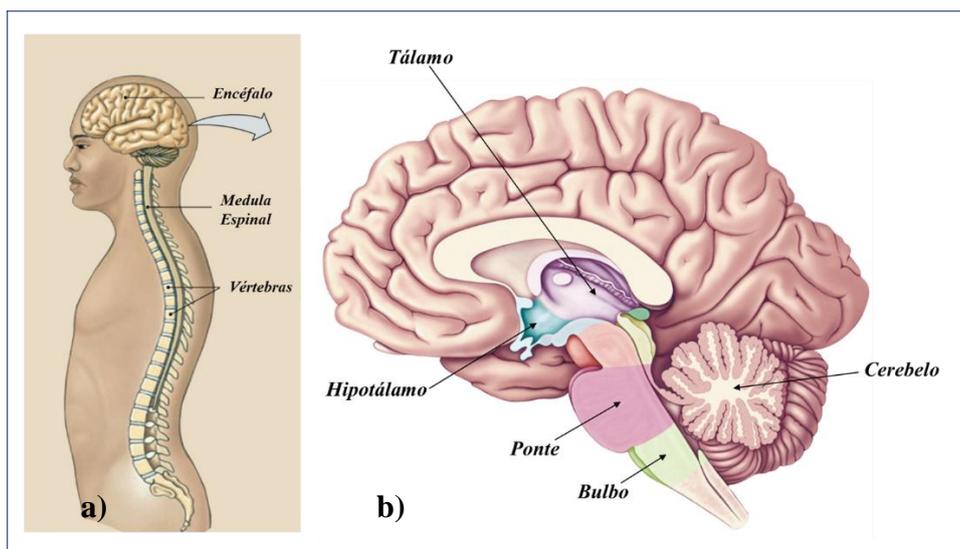


Figura 2.3 - Sistema nervoso central de humanos: a) Vista lateral (SILVERTHORN, 2010); b) Corte sagital do encéfalo (BEAR *et al.*, 2017).

Em uma visão simplista, o encéfalo é um processador de informações muito semelhante a um computador. Ele recebe informações sensoriais dos meios interno e externo, integra e processa a informação e, se apropriado, gera uma resposta. O que torna o encéfalo mais complicado do que essa via reflexa simples, entretanto, é a sua habilidade de gerar informações e respostas ainda que na ausência de um estímulo externo (SILVERTHORN, 2010).

Os três principais componentes anatômicos do encéfalo, são: o cérebro propriamente dito, o diencéfalo e o cerebelo. Em geral, o cérebro controla os movimentos, recebe e interpreta os estímulos sensitivos, coordena os atos de inteligência, de memória, de raciocínio e de imaginação.

II.1.2.1 Telencéfalo ou Cérebro

Cérebro é o órgão mais volumoso e mais importante do sistema nervoso. Divide-se em dois hemisférios cerebrais, direito e esquerdo, que são bastante desenvolvidos, ligados pelo corpo caloso. A superfície do cérebro apresenta várias depressões chamadas sulcos cerebrais que delimitam várias circunvoluções chamadas de giros cerebrais. O fato da superfície cerebral se dispor desta forma permite que uma grande parte dela esteja “escondida em dobras” se ajustando a caixa craniana, isto em encéfalos de humanos, visto que em camundongos, o encéfalo, especificamente o córtex, não possui giros e sulcos.

A superfície do cérebro pode ser dividida em cinco regiões chamadas lobos, Figura 2.4. Cada lobo recebe o nome do osso craniano que o recobre, desempenhando funções específicas como:

- ✓ Lobo Frontal: Fala, pensamento lógico e olfato;
- ✓ Lobo Temporal: Interpreta qualquer tipo de som;
- ✓ Lobo Parietal: Paladar, linguagem, tato, temperatura, dor e postura do corpo;
- ✓ Lobo Occipital: Visão; e
- ✓ Lobo da Insula: Coordena o sistema límbico, emoções e paladar.

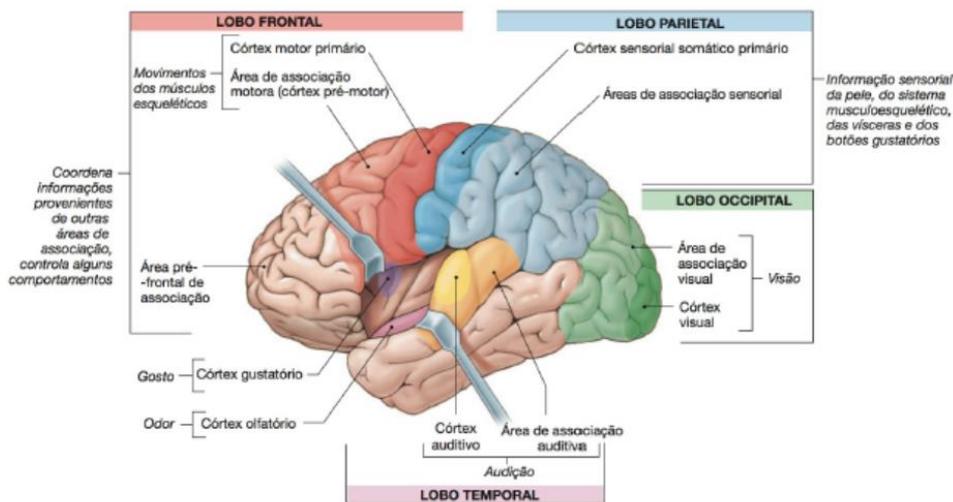


Figura 2.4 - Córtex cerebral e suas funções especializadas (SILVERTHORN, 2010).

O encéfalo é revestido por uma fina camada de substância cinzenta conhecida como córtex cerebral. O córtex é uma das partes mais importantes do sistema nervoso central. Nele chegam impulsos provenientes de todas as vias de sensibilidade que aí se tornam consciente e são interpretadas. Do córtex saem também impulsos nervosos que iniciam e comandam os movimentos voluntários. Desta maneira, o córtex cerebral atua como centro integrador para informação sensorial e como uma região de tomada de decisões para muitos tipos de respostas motoras. Se observarmos o córtex do ponto de vista funcional, ele pode ser dividido em três especializações:

- ✓ Áreas sensoriais: Também chamadas de campos sensoriais, as quais recebem estímulos sensoriais e os traduzem em percepção, ou seja, consciência;
- ✓ Áreas motoras: As quais comandam os movimentos dos músculos esqueléticos; e
- ✓ Áreas de associação (córtices de associação): As quais integram informações de áreas motoras e sensoriais e podem comandar comportamentos voluntário.

As informações que passam por uma via em geral são processadas em mais de uma dessas áreas.

II.1.2.2 Substância Negra

A substância negra é um núcleo compacto formado por neurônios que contêm melanina situada no mesencéfalo. Uma característica importante da maioria dos neurônios da substância negra é que eles utilizam como neurotransmissores a dopamina, ou seja, são neurônios dopaminérgicos. A degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra causam uma diminuição de dopamina no corpo estriado, provocando graves perturbações motoras que caracterizam, por exemplo, a doença de Parkinson (MACHADO *et al.*, 2013).

II.1.2.3 Cerebelo

O cerebelo localiza-se posteriormente à ponte, divide-se em dois lobos cerebelares sendo ligados pelo centro do vérmis cerebelar. O cerebelo é, primariamente, um centro para o controle dos movimentos iniciados pelo córtex motor, ou seja, recebe informações do córtex motor e dos gânglios basais de todos os estímulos enviados aos músculos. A partir das informações do córtex motor sobre os movimentos que pretende executar e de

informações proprioceptivas que recebe diretamente do corpo (articulações, músculos, áreas de pressão do corpo, aparelho vestibular e olhos), avaliando o movimento executado. Após a comparação entre o desempenho e aquilo que se teve em vista realizar, estímulos corretivos são enviados de volta ao córtex para que o desempenho real seja igual ao pretendido. Desta forma, o cerebelo relaciona-se com os ajustes dos movimentos, equilíbrio, postura e tônus muscular. Lesões do cerebelo resultam em movimentos desordenados e imprecisos (BEAR *et al.*, 2017).

II.1.2.4 Diencéfalo – Tálamo e Hipotálamo

O diencéfalo é a parte do cérebro entre o tronco cerebral e o telencéfalo, recoberto pelos hemisférios cerebrais. É constituído pelo tálamo e hipotálamo.

Tálamo

Tálamo é a região de substância cinzenta localizada entre o tronco encefálico e o cérebro. O tálamo atua como estação retransmissora de impulsos nervosos para o córtex cerebral. Ele é responsável pela condução dos impulsos às regiões apropriadas do cérebro onde devem ser processados. O tálamo também está relacionado com alterações no comportamento emocional, que ocorrem não só da própria atividade, mas também de conexões com outras estruturas do sistema límbico, que regula as emoções (BEAR *et al.*, 2017).

Hipotálamo

O hipotálamo também é constituído pela substância cinzenta, é o principal centro integrador das atividades dos órgãos viscerais, sendo responsável pela homeostase corporal. Faz ligação entre os sistemas nervoso e endócrino, atuando na ativação de glândulas endócrinas, como, por exemplo, a hipófise. O hipotálamo controla a temperatura corporal, regula o apetite, o balanço hídrico, o sono e está envolvido também nas emoções e no comportamento sexual (BEAR *et al.*, 2017).

II.1.2.5 Amígdala

A amígdala é uma pequena estrutura localizada na região anteroinferior do lobo temporal, tem a forma de uma amêndoa e se interliga com o hipocampo, com os núcleos

septais, com a área pré-frontal, e com o tálamo. Estas ligações caracterizam sua função de controle das atividades emocionais como amizade, amor, afeição, exteriorização do humor e, principalmente, os estados de medo, ira e agressividade. É essencial a autopreservação, originando medo e a ansiedade, colocando o indivíduo em alerta ou prontidão para luta ou fuga (MACHADO *et al.*, 2013). A amígdala comunica-se com áreas envolvidas no processo de memória, como o hipocampo e córtex, e parece ter função na associação de emoções/memórias (KANDEL, 2000).

II.1.2.6 Hipocampo

O hipocampo é uma das principais estruturas do cérebro de mamíferos. Pertence ao sistema límbico e desempenha papéis importantes na memória de longo prazo, navegação e memória espacial. Está diretamente ligado ao córtex cerebral e possui metades espelhadas nos lados esquerdo e direito do cérebro. Em humanos e outros primatas, o hipocampo está localizado dentro do lobo temporal medial, sob a superfície cortical. Pessoas com danos extensivos no hipocampo podem experimentar amnésia, a incapacidade de formar ou manter novas memórias. O dano ao hipocampo também pode resultar da falta de oxigênio (hipóxia), encefalite ou epilepsia do lobo temporal medial. Na doença de Alzheimer, o hipocampo é uma das primeiras regiões do cérebro a sofrer danos: problemas de memória e desorientação aparecem entre os primeiros sintomas (SILVERTHORN, 2010).

II 1.3 Memória

De um ponto de vista prático, a memória dos homens e dos animais é a capacidade de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente. O armazenamento e evocação de informações adquiridas através de experiências, a aquisição de memórias, denomina-se aprendizado. O aprendizado e a memória são propriedades básicas do sistema nervoso, não existe atividade nervosa que não inclua ou não seja afetada de alguma forma pelo aprendizado e pela memória. Aprendemos a caminhar, pensar, amar, imaginar, criar, etc, e nossa vida depende de que nos lembremos de tudo isso.

Consideráveis avanços têm ocorrido, nas últimas décadas, em relação à compreensão sobre o funcionamento da memória. Resultados apontam cada vez mais que

a memória não se localiza apenas em uma região, tendo suas funções compartilhadas por múltiplas estruturas de acordo com sua especificidade (IZQUIERDO, 2011).

A memória pode ser classificada em diferentes aspectos, por exemplo, quanto ao conteúdo (memória declarativa e procedurais) e quanto ao tempo de duração (memórias de curta e longa duração) (LENT, 2010).

II 1.3.1 Memórias Declarativas

Memórias declarativas são memórias que registram fatos, eventos, ou conhecimento e são assim denominadas pois é possível declarar que existem e podemos relatar como é adquirida. Entre elas, as memórias referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos denominam-se episódicas ou autobiográficas, e as de conhecimentos gerais, semânticas.

Tanto as memórias episódicas quanto as semânticas requerem, para o seu bom funcionamento, na aquisição, na formação e evocação, uma boa memória de trabalho. A memória de trabalho serve para manter durante alguns segundos, no máximo alguns minutos, a informação que está sendo processada no momento. Este tipo de memória é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal, ou seja, as memórias episódicas e semânticas necessitam de um bom funcionamento do córtex pré-frontal (LENT, 2010).

As principais estruturas nervosas responsáveis pelas memórias declarativas episódicas e semânticas são duas áreas intercomunicadas do lobo temporal: o hipocampo e o córtex entorrinal. Ambas trabalham associadas entre si e em comunicação com outras regiões do córtex, com os núcleos basal e amígdala, que são também moduladores da formação e evocação da memória. Além de modular, a amígdala também armazena memórias, principalmente quando estas têm componentes de alerta emocional. No Alzheimer e em outras doenças neurodegenerativas com perda de memórias, as lesões características de cada uma aparecem primeiro no córtex entorrinal e no hipocampo e, mais tarde, no córtex pré-frontal e parietal (IZQUIERDO, 2011).

II 1.3.2 Memórias Procedurais

Memórias procedurais são memórias de capacidades ou habilidades motoras e sensoriais e que, comumente, chamamos de “hábitos”. São aquelas memórias que não

conseguimos verbalizar, para demonstrar que as temos, devemos, de fato, demonstrá-las. Exemplos típicos são as memórias de andar de bicicleta, nadar, saltar, dirigir ou soletrar.

Os circuitos responsáveis pelas memórias de procedimentos envolvem o núcleo caudato, que é inervado pela substância negra, e o cerebelo. Algumas delas também utilizam circuitos do lobo temporal, hipocampo e córtex entorrinal, nos primeiros dias após a aquisição. Só são observadas falhas notórias da memória procedural nas fases mais avançadas da DA ou Doença de Parkinson (DP), em que há lesões na substância negra e disfunção de sua conexão com o núcleo caudato, que se encarrega do controle motor.

As memórias de procedimentos ou implícitas sofrem pouca modulação pelas emoções ou pelo estado de ânimo. A principal modulação destas memórias é pela substância negra, que pode explicar, por exemplo, a aparição, o aumento, ou a diminuição de tremores ou alterações do tônus muscular, que muitas vezes são observados quando somos vítimas de tensões emocionais e queremos fazer ou deixar de fazer determinado movimento. A ansiedade intensifica a rigidez e os tremores da DP (IZQUIERDO, 2011).

II 1.3.3 Memória de Curta Duração

A memória denominada de curta duração estende-se desde os primeiros segundos ou minutos seguintes ao aprendizado até 3 a 6 horas; quer dizer, o tempo que leva a memória de longa duração para ser efetivamente construída. A memória de curta duração não deve ser confundida com a memória de trabalho. Certamente a memória de trabalho é curta, e dura desde poucos segundos até, no máximo, 3 minutos. Mas o principal é que seu papel não é formar “arquivos”, mas sim o de analisar informações que chegam constantemente ao cérebro e compará-las às existentes nas demais memórias, declarativas e procedurais, de curta ou longa duração (LENT, 2010).

II 1.3.4 Memória de Longa Duração

As memórias de longa duração não ficam estabelecidas na sua forma estável ou permanente imediatamente depois de sua aquisição. Assim, as memórias declarativas de longa duração levam um tempo até serem consolidadas. A consolidação é o processo que leva a fixação definitiva da memória de maneira que, mais tarde, poderão ser evocadas nos dias ou nos anos seguintes. A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos, no hipocampo e em outras estruturas cerebrais, que

compreendem diversas fases e requerem entre três e oito horas (IZQUIERDO, 2000). Relacionado à consolidação da memória de longa duração está o fenômeno chamado de potenciação de longa duração, que consiste no aumento persistente da resposta de neurônios a breve estimulação repetitiva de um axônio ou um conjunto de axônios que fazem sinapses com elas (LENT, 2010).

II.1.4 Cérebro e Envelhecimento

A medida que se envelhece, o corpo muda, o cabelo fica mais fino, a pele enrugada, e as articulações estalam. As capacidades motoras, por exemplo, declinam nos idosos. A postura de um idoso é menos ereta que a de um adulto jovem. O andar é mais lento e o passo mais curto. Os reflexos posturais frequentemente são lentos, deixando o indivíduo mais suscetível ao desequilíbrio. Assim, não é de se surpreender que o encéfalo também mude. De fato, muitas alterações comportamentais ocorrem com a idade, afetando quase todos os indivíduos, fornecendo evidências de alterações subjacentes no sistema nervoso. Desta maneira, o SNC é extremamente afetado pelo processo de envelhecimento. Todas as alterações fisiológicas relacionadas ao envelhecimento são consequências de mudanças nos processos químicos associados a este sistema.

II.1.4.1 Alterações Fisiológicas Macroscópicas do SNC

Macroscopicamente, evidências mostram que a partir dos 25 anos de idade ocorre uma redução do encéfalo de 1,4 a 1,7% por década de vida. Aos 90 anos, o volume encefálico se reduz em até 200 cm³ e possui, aproximadamente, 10% a menos de massa que aos 30 anos. Durante o processo de envelhecimento, podem ser evidenciadas também alterações nos sulcos e giros. Os giros sofrem estreitamento, enquanto que os sulcos se tornam mais largos e profundos sendo a hipotrofia mais acentuada nos lobos frontal e temporal, especialmente no complexo amígdala-hipocampal do lobo temporal que tem papel na memória e aprendizado, e no córtex pré-frontal que é uma área motora (CANÇADO *et al.*, 2002, GARBELLINI, 2007).

Os ventrículos também sofrem alargamento e aumento do volume médio devido à perda de fibras nervosas da substância branca e a perda neuronal cortical e subcortical. Além disto, o cerebelo também sofre perda ponderal, que é a redução de massa devido à

perda de fluidos e hipotrofia das três camadas corticais. Por fim, há a hipotrofia do tronco cerebral (PITELLA, 1994).

II.1.4.2 Alterações Fisiológicas Microscópicas do SNC

Microscopicamente, as alterações fisiológicas do SNC decorrem da perda normal e gradual das células nervosas e/ou acúmulo gradual de alterações químicas que resultam em distúrbios da função de sistemas químicos específicos (CARVALHO *et al.*, 1994, RIBEIRO, 1994). São grandes as mudanças nos processos bioquímicos cerebrais com o avançar da idade, principalmente, em função do aumento de radicais livres neurotóxicos e, com isto, várias alterações fisiológicas a nível microscópico também são observadas, como a hipotrofia neuronal e alterações nos sistemas de neurotransmissores. Apesar destas mudanças serem comuns ao envelhecimento, deixam todo o SNC mais vulnerável a neurodegeneração.

A hipotrofia neuronal e a morte celular estão entre as principais causas das alterações do sistema nervoso associado ao envelhecimento e são caracterizadas pela perda de substância branca no cérebro (GARBELLINI, 2007). A hipotrofia neuronal é marcada pela retração do corpo celular com a redução da sua capacidade funcional, provavelmente em decorrência de modificações na sua citoestrutura, bem como na sua capacidade de transmissão de sinais (CANÇADO *et al.*, 2002, GARBELLINI, 2007). Os neurônios do hipocampo apresentam também redução ou perda de espinhas dendríticas sintetizadoras de neurotransmissores causando a redução da superfície de contato para as sinapses, comprometendo assim, as funções de aprendizado e memória (CANÇADO *et al.*, 2002, GARBELLINI, 2007, PITELLA, 1994).

Juntamente a hipertrofia neuronal, há, durante o envelhecimento, uma redução na produção, liberação e metabolismo dos neurotransmissores, ocorrendo reduções nas concentrações de mensageiros secundários e de enzimas envolvidas nas transduções de sinais. O cálcio, que regula funções como a síntese e liberação de neurotransmissores e excitabilidade neuronal, apresenta, no cérebro envelhecido, um aumento intracelular significativo que pode levar a morte celular (CANÇADO *et al.*, 2002).

Os neurotransmissores dopaminérgicos são os mais afetados com o envelhecimento. Distúrbios nas atividades dopaminérgicas são responsáveis por alterações motoras presentes em idades avançadas (GARBELLI, 2007, RIBEIRO, 1994).

Além destes, outros neurotransmissores, como o GABA, serotonina, catecolaminas, acetilcolina e receptores colinérgicos, também apresentam níveis mais baixos em idosos.

II.1.4.3 Radicais Livres e o Envelhecimento

Radicaís livres são espécies que apresentam elétrons desemparelhados e, portanto, reagem facilmente com outras moléculas. São considerados os maiores causadores do processo de envelhecimento e declínio das funções orgânicas. São responsáveis tanto pelo envelhecimento físico como pelo mental. No cérebro, atuam de forma mais intensa e precoce, levando a perda neuronal e, conseqüentemente, a perda de memória que caracterizam as doenças neurodegenerativas.

O cérebro é o mais afetado pela ação dos radicaís livres porque é um órgão rico em ácidos graxos poli-insaturados e, com isto, consome uma quantidade elevada de oxigênio gerando radicaís livres formados por espécies reativas de oxigênio (ROS). O excesso de radicaís livres pode levar ao estresse oxidativo.

II.1.4.4. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre processos bioquímicos que levam a produção de ROS e os antioxidantes. Os antioxidantes têm a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicaís livres ou ROS (HARMAN, 1981). A superprodução de radicaís livres pode causar danos oxidativo a biomoléculas (lipídios, proteínas, DNA), podendo, eventualmente, ser a causa de muitas doenças crônicas que apresentam maior incidência com o avanço da idade, como a aterosclerose, câncer, diabetes, artrite reumatoide, lesão pós-isquêmica, infarto do miocárdio, doenças cardiovasculares, inflamação crônica, acidente vascular cerebral, choque séptico, entre outras doenças degenerativas (FREIDOVICH, 1999, FANG *et al.*, 2002).

O SNC é particularmente vulnerável à ação oxidativa em função da alta taxa de utilização de O₂. As concentrações relativamente menores de antioxidantes e o alto teor de lipídios poli-insaturados tornam esta região mais suscetível à oxidação. As ROS atacam células gliais e neurônios, que são células particularmente sensíveis aos radicaís livres, levando ao dano neuronal (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001). Foi relatado que as lesões oxidativas em células podem levar a morte celular programada, isto é, apoptose

(SALGANIK, 2001). Além disto, existem concentrações regionalmente altas de metais de transição redox ativos, capazes de gerar catalizadores de ROS. Assim, não é surpreendente que o estresse oxidativo seja um ponto de discussão comum para doenças neurodegenerativas, onde o dano aos neurônios pode refletir tanto o aumento dos processos oxidativos quanto a diminuição das defesas antioxidantes (SAYRE *et al.*, 2008).

II.2 A Doença de Alzheimer (DA)

A Doença de Alzheimer foi observada pela primeira vez pelo psiquiatra Alois Alzheimer em 1906 na paciente Auguste Deter, e recebeu esta designação em 1910 por Emil Kraepelin. É uma desordem neurodegenerativa irreversível e progressiva. Sua incidência é maior em pessoas com mais de 65 anos. Atualmente, é previsto um crescimento de 62% entre 2015 e 2030 em sua incidência, o que é aproximadamente 1 bilhão de pessoas portadoras de Alzheimer em todo mundo (UNITED STATES CENSUS BUREAU, 2018). As características clínicas da DA incluem perda de memória a curto prazo, problemas com a linguagem, desorientação e alterações de humor. Morfologicamente, o cérebro do paciente com a DA, no estágio final, é caracterizado pela redução da formação hipocampal e do córtex, além do alargamento dos ventrículos laterais e estreitamento dos giros, Figuras 2.5a e 2.5b. Entre as principais características neuropatológicas associadas à DA estão os emaranhados neurofibrilares e a presença de placas senis formadas pelo peptídeo A β em regiões do cérebro responsáveis pela cognição e memória, Figuras 2.5c e 2.5d.

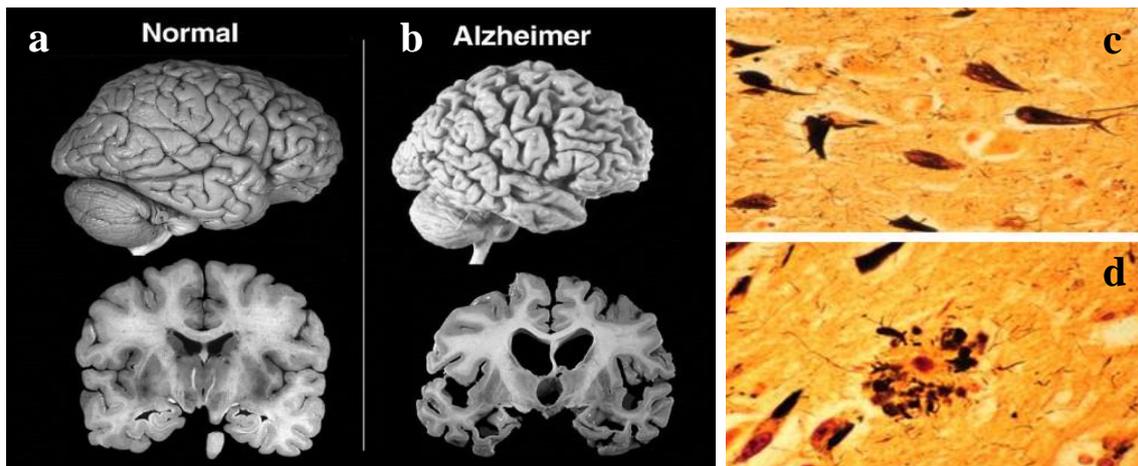


Figura 2.5 - Evolução da DA macroscopicamente e microscopicamente: a) Cérebro sadio; b) Cérebro acometido pela doença exibindo considerável alargamento dos sulcos e estreitamento dos giros, além de notável atrofia em comparação ao cérebro sadio, corte coronal revelando o aumento do volume ventricular e a perda de massa cerebral; c) Emaranhados neurofibrilares (intracelulares) corados por prata; d) Placas senis (extracelulares) coradas por prata (KENDEL *et al.*, 2014).

II.2.1 Peptídeo β -amiloide ($A\beta$) e a Cascata Amiloide

No início da década de 90, foi proposto pela primeira vez a “hipótese da cascata amiloide” que postula que o peptídeo $A\beta$ e/ou os produtos de clivagem da sua proteína precursora, uma glicoproteína integral denominada proteína precursora amiloide (APP), são neurotóxicos e podem levar à formação das placas senis, resultando em morte celular (HARDY *et al.*, 1992). Embora a deposição de origem amiloide (peptídeo $A\beta$) possa ser também detectadas em pequenas quantidades em cérebros de idosos sadios, a produção deste tipo de peptídeo é considerada central na patologia da DA. Em uma descrição recente, a cascata amiloide foi resumida da seguinte maneira: ao longo do tempo, um desequilíbrio na produção ou na liberação do peptídeo $A\beta$ leva a acumulação e agregação gradual do peptídeo no cérebro iniciando uma cascata neurodegenerativa que envolve a deposição amiloide, inflamação, estresse oxidativo, lesão e perda neuronal (LEMERE *et al.*, 2010).

A formação do peptídeo $A\beta$, composto de 39-42 aminoácidos, é resultado da clivagem da APP, uma proteína transmembranar. Evidências têm sugerido um importante papel da APP na regulação da sobrevivência neuronal, no crescimento neurítico, na plasticidade sináptica e na adesão celular (MATTSON *et al.*, 2003). Duas secretases, a γ -

secretase e a β -secretase (BACE), clivam a APP em diferentes lugares originando fragmentos $A\beta$ de diferentes tamanhos, entre eles fragmentos com 40 e 42 aminoácidos, Figura 2.6. Apesar do fragmento com 40 aminoácidos ser o mais comum, atualmente considera-se que o fragmento com 42 aminoácidos possui um maior potencial amiloidogênico, ou seja, maior tendência em agregar-se, embora ambos sejam capazes de se agregar e originar protofibrilas, fibrilas e por fim, placas insolúveis (PIMPLIKAR, 2009).

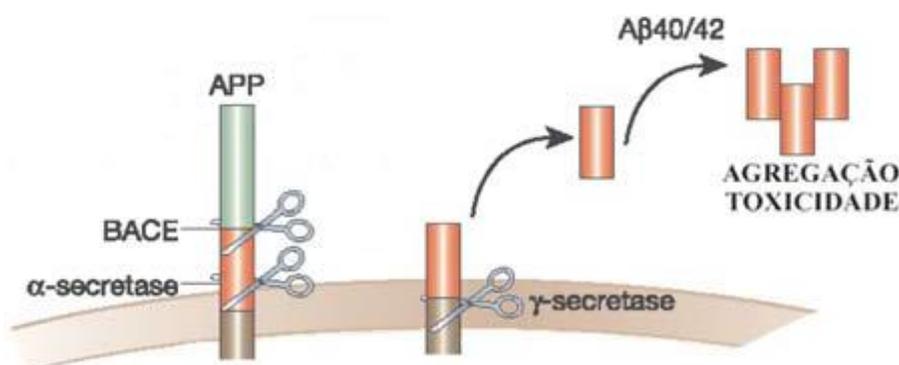


Figura 2.6 - Na superfície celular, clivagem da proteína precursora amiloide (APP). No processo, a APP é clivada primeiro pela BACE e, em seguida, pela γ -secretase, levando a secreção do peptídeo tóxico $A\beta$ (Adaptado de MATTSON, 2004).

O $A\beta$ produzido pode ter basicamente dois destinos: permanecer em forma solúvel no meio extracelular, ou agregar-se tornando-se insolúvel e depositando-se na forma de placas senis. O peptídeo $A\beta$ pode ser encontrado na forma de monômeros e em estruturas compostas por dímeros e trímeros, formando as denominadas arquiteturas “monoméricas” ou “oligoméricas”, enquanto as “protofibrilas” representam estruturas de ordem intermediária entre os agregados e as fibrilas presentes nas placas senis (GANDY, 2005). As formas oligoméricas e fibrilares do $A\beta$ causam comprometimento da potencialização a longo prazo e disfunção sináptica, acelerando a formação de emaranhados neurofibrilares que eventualmente causam a falha sináptica e morte neuronal.

A existência de indivíduos sadios que apresentam depósitos amiloide tem sido um desafio para a hipótese da cascata amiloide. Desta forma, a cascata amiloide não pode ser resumida à formação de placas senis, mas deve ser compreendida como um processo dinâmico e complexo em que não apenas a forma fibrilada, mas também as formas

intermediárias ou alternativas de polimerização do peptídeo exerceriam papel crucial nas alterações neuronais observadas na DA. Como os depósitos em placas senis são o resultado macroscópico de um processo que começa com agregados oligoméricos menores, é possível que os indivíduos positivos para a presença de placas amiloide sejam positivos também para a presença de A β O antes mesmo do aparecimento dos depósitos (HERRUP, 2015).

II.2.2 Hipótese dos Oligômeros de A β na Doença de Alzheimer

Por muito tempo, a forma agregada e insolúvel do A β foi considerada a única forma patogênica deste peptídeo. Embora a hipótese amiloide ofereça um amplo quadro para explicar a patogênese da DA, em certas observações, a versão mais simples da hipótese não se encaixa facilmente. Um dos maiores problemas que a hipótese amiloide enfrenta é a falta de relação entre o número de depósitos A β no cérebro e o grau de comprometimento cognitivo do paciente. Na verdade, alguns seres humanos sem sintomas da DA apresentam muitos depósitos corticais de A β .

Estudos recentes indicam que os A β O poderiam apresentar grande potencial neurotóxicos e afetar de forma significativa diferentes vias de sinalização celular. Os A β O foram identificados a partir de frações solúveis retiradas do córtex cerebral de pacientes com DA, indicando ser a primeira forma de acúmulo do peptídeo (TABATON *et al.*, 1994). Os A β O podem inibir diretamente a potenciação de longa duração hipocampal e prejudicar a função sináptica, somando-se ao processo inflamatório e ao estresse oxidativo causado pelo A β fibrilar. Estes processos comprometem as funções neuronal e sináptica, o que resulta em déficits de neurotransmissores e no surgimento de sintomas cognitivos (HARDY *et al.*, 2002).

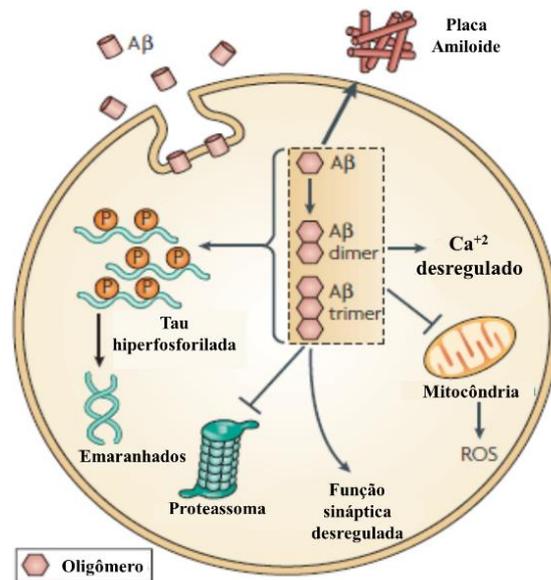


Figura 2.7 - Neurotoxicidade dos oligômeros β -amiloide ($A\beta$, adaptado de La FERLA *et al.*, 2007).

Diferentes formas do peptídeo $A\beta$ foram identificadas com funções e propriedades específicas (HE *et al.*, 1999). O peptídeo $A\beta$ pode ser encontrado na forma de monômeros e em estruturas compostas por dímeros e trímeros, formando as denominadas arquiteturas “monoméricas” ou “oligoméricas”, enquanto as “protofibrilas” representam as estruturas de ordem intermediária entre os agregados mencionados e as fibrilas presentes nas placas senis (GANDY, 2005).

Verificou-se, recentemente, que a estrutura em grampo do $A\beta$ pode rearranjar-se em diferentes conformações, o que explicaria a variedade de espécies oligoméricas observadas (GU *et al.*, 2013). Diferentes tamanhos e formatos já foram descritos com vias diferentes de formação, indicando a complexidade do mecanismo de formação. A formação parece também diferir para oligômeros intracelulares e extracelulares. Assim, as estruturas dos oligômeros e a formação das fibrilas são consideravelmente dependentes do meio celular (SOKONO *et al.*, 2010, BENILOVA *et al.*, 2012).

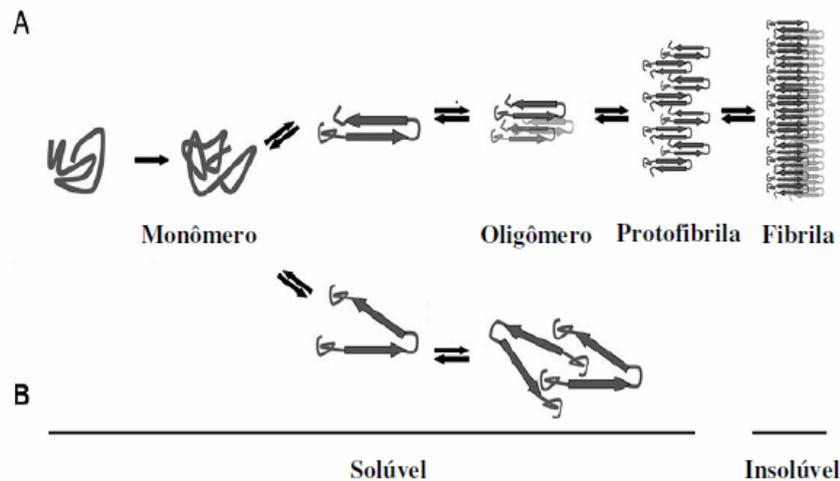


Figura 2.8 - Processo de oligomerização e fibrilação do peptídeo β -amiloide: a) O peptídeo β -amiloide pode sofrer um processo sequencial de agregação, formando oligômeros, protofibrilas e fibrilas insolúveis; b) Alternativamente, o β -amiloide pode sofrer um processo de oligomerização independente, formando oligômeros que, embora não evoluam para formação de fibrilas, apresentariam considerável efeito neurotóxicos (KREUTZ, 2010).

Os oligômeros e as protofibrilas parecem ser os estados de aglomeração de maior toxicidade (KAYED *et al.*, 2004, KLEIN *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* demonstraram que os oligômeros de $A\beta$ exercem uma forte ação inibitória sobre a potenciação de longa duração, um fenômeno de melhoria na transmissão do sinal entre dois neurônios, que contribui para a plasticidade sináptica (PUZZO *et al.*, 2005). Estas pequenas toxinas também iniciam complexas sinalizações intracelulares que culminam com a morte neuronal observada em fases mais avançadas da doença (FERREIRA *et al.*, 2015).

A hipótese dos $A\beta$ Os propõe que os primeiros sintomas cognitivos da doença estão associados a perdas sinápticas provocadas pelo ataque direto dos $A\beta$ Os. Desta forma, estudos têm demonstrado que o $A\beta$ Os pode ser o link que falta entre a cascata amiloide e o desenvolvimento da DA. A cascata amiloide apresenta fraca correlação entre os depósitos insolúveis de β -amiloide e o estado cognitivo.

II.3 Estresse Oxidativo na Doença de Alzheimer

No cérebro de um paciente com a DA, além do acúmulo de placas amiloides e de emaranhados neurofibrilares, ocorre também uma alteração nas reações redox, assim há um aumento nos danos oxidativos (ZAWIA *et al.*, 2009). Em modelos experimentais de

cérebros humanos, evidências sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na neurodegeneração da DA (CHAUHAN *et al.*, 2006). Este poderia ser, provavelmente, o fator desencadeante da doença, uma vez que é uma das primeiras características observadas no cérebro com a DA, podendo aparecer décadas antes dos primeiros sintomas. Suspeita-se que a secreção e a deposição do A β , assim como sua agregação em placas senis, ocorrem em segundo plano, funcionando como um esforço das células na tentativa de se proteger dos danos causados pelo estresse oxidativo (LIU *et al.*, 2009).

Embora ainda não tenha sido estabelecido se o estresse oxidativo é uma causa ou consequência do processo patológico subjacente, existe um consenso de que o estresse oxidativo é uma característica proeminente da DA (BAYER *et al.*, 2006, MATTSON *et al.*, 2003, AXLSEN *et al.*, 2011).

Estudos indicam que o acúmulo excessivo ou o desequilíbrio na concentração e distribuição de elementos podem afetar o funcionamento das células, o que pode levar a sua degeneração e até mesmo a morte celular. Íons metálicos são fundamentais na produção de espécies reativas de oxigênio que afetam a homeostase redox celular. O estresse oxidativo e o acúmulo de íons estão relacionados com a produção e mudanças nas concentrações tanto do A β solúvel quanto do depósito do peptídeo A β (MUNDY *et al.*, 2000).

II.4 Metais e a Doença de Alzheimer

Ainda resta muito a se estudar e aprender sobre o mecanismo pelo qual as proteínas associadas as doenças neurodegenerativas se agregam e formam estruturas que afetam as funções das regiões aos quais estão associadas. Tem sido amplamente demonstrado que íons metálicos são potenciais fatores de risco em várias doenças neurodegenerativas tais como DA, DP e Esclerose Lateral Amiotrófica.

Dentro do cérebro, os metais têm uma distribuição altamente compartimentada, dependendo da função primária que desempenham dentro do SNC. Metais em níveis ótimos são necessários em uma série de processos metabólicos e fisiológicos do corpo humano. Alguns destes metais tais como ferro, cobre e zinco quando ligados a proteínas (metaloproteínas) desempenham uma variedade de funções biológicas complexas como catalisadores que regulam reações bioquímicas e funções fisiológicas em células e órgãos. Mesmo que a quantidade necessária destes para muitas funções biológicas sejam bem

pequenas, suas deficiências causam vários distúrbios metabólicos. Por outro lado, em níveis elevados os elementos traços podem se tornar tóxicos e afetar as atividades biológicas. Por exemplo, a desregulação dos níveis de íons metálicos também pode induzir o influxo de cálcio (Ca^{2+}) que é parte de uma via de sinalização que leva à morte celular (MUNDY *et al.*, 2000).

O Cu, Fe e Zn são encontrados nas placas amiloides em altas concentrações (~mM) (FALLER *et al.*, 2008) porque A β é capaz de se ligar a estes metais com afinidades diferentes, o que pode variar dependendo do estado agregado e comprimento do A β e pH do meio (ATWOOD *et al.*, 2000). A interação de metais com A β Os também pode contribuir para a sua precipitação dentro da fenda sináptica, deixando o tecido cerebral e células com deficiência destes metais (ROBERTS *et al.*, 2012). Portanto, a interação de metais por ligação a A β e ao A β Os pode contribuir para a disfunção sináptica e déficit cognitivo.

A presença de metais como ferro, cobre e zinco em placas A β de tecido cerebral afetado pela DA, e a presença de metais tóxicos como potenciais cofatores patológicos da AD, indicam que estes metais estão diretamente envolvidos no processo neurodegenerativo da DA (HUTCHINSON *et al.*, 2005, LELIE *et al.*, 2011; PITHADIA *et al.*, 2012; STAVITSKI E *et al.*, 2013, BUSH, 2003, IDE-EKTESSABI, 2005)

II.4.1 Ferro

O ferro está presente em diversos processos biológicos fundamentais do cérebro incluindo: transporte de oxigênio, síntese de DNA, respiração mitocondrial, síntese de mielina, síntese e metabolismo de neurotransmissores como dopamina, serotonina e GABA (CRICHTON, 2009). A homeostase do Fe é essencial para manter as funções biológicas normais do cérebro, enquanto que a falta de regulação da homeostase pode causar neurotoxicidade através de diferentes mecanismos. Quando a concentração de Fe excede a capacidade de armazenamento celular, os níveis de Fe instável podem aumentar, tornando-se nocivo, levando ao dano oxidativo e a morte celular (KRUSZEWSKI, 2003). A homeostase permite condições ótimas para o bom funcionamento celular mantendo o equilíbrio das concentrações de Fe disponíveis entre os compartimentos celulares, prevenindo, assim, as células dos efeitos tóxicos causados pelo excesso de ferro livre (HENTZE *et al.*, 2010, WANG *et al.*, 2011). Durante os últimos 15 anos, a sociedade científica tem feito progressos no sentido de entender a homeostase do ferro (SCHLIEF

et al., 2006). Entretanto, ainda não foi totalmente elucidado como são regulados o fluxo e o armazenamento de Fe em neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e células gliais.

II.4.1.1 Ferro e o Envelhecimento

No envelhecimento de um indivíduo saudável, ocorre naturalmente o acúmulo de Fe em várias regiões e tipos celulares, principalmente, com o Fe ligado à ferritina e a neuromelanina (ZECCA *et al.*, 2001 e 2004). Entretanto, concentrações de Fe maiores que as reportadas no envelhecimento normal, em áreas específicas do cérebro, ocorre em diversas doenças neurodegenerativas e é frequentemente associada ao estresse oxidativo e ao dano celular. Se o acúmulo de Fe observado nas doenças neurodegenerativas é um evento primário ou um efeito secundário, ainda não foi determinado. Por outro lado, no envelhecimento é observado um aumento na neurodegeneração. Desta maneira, acúmulo de Fe relacionado ao envelhecimento pode ser um importante fator que contribui com o processo neurodegenerativo.

O aumento dos níveis totais do Fe com o envelhecimento pode ter diversos fatores como causa tais como, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, inflamação, redistribuição do Fe dentro do cérebro e mudanças na homeostase (CONDE *et al.*, 2006, FARRAL *et al.*, 2009). O processo de envelhecimento pode levar ao comprometimento do sistema homeostático do ferro (KILLILEA *et al.*, 2004) levando a um excesso de Fe que não são eficientemente quelados pelas proteínas e outras moléculas. O acúmulo de ferro nos neurônios pode induzir a apoptose. Além disto, o excesso glial de Fe pode induzir um estado inflamatório através do aumento de citocinas pró-inflamatórias (WILLIAMS *et al.*, 2012) que resultam em um ciclo de neuroinflamação e, conseqüente, neurodegeneração (XU *et al.*, 2012).

A distribuição de Fe em cérebros de adultos saudáveis é heterogênea. As concentrações mais elevadas deste elemento são encontradas na substância negra e gânglio basal (putâmen, globus pallidus e núcleo caudado) (GOTZ *et al.*, 2004), enquanto que, baixas concentrações são detectadas na massa cinzenta cortical, matéria branca, mesencéfalo e cerebelo (ZECCA *et al.*, 2001, ZECCA *et al.*, 2004, ZECCA *et al.*, 2006, HOUSE *et al.*, 2012, RAMOS *et al.*, 2014). Em geral, as áreas do cérebro responsáveis pelas funções motoras apresentam níveis maiores de Fe do que regiões que não controlam funções motoras, o que explica a frequente associação das doenças motoras aos níveis de Fe (CASS *et al.*, 2007). Com o envelhecimento, as concentrações totais de Fe aumentam

na substância negra, putâmen, globus pallidus, núcleo caudado e córtex (ZECCA *et al.*, 2004, RAMOS *et al.*, 2014). Mas o porquê este aumento é específico em algumas áreas do cérebro, ainda não foi elucidado. Além das mudanças citadas anteriormente, também são observadas mudanças na disponibilidade das formas moleculares do Fe (ferritina, neuromelanina, transferrina, entre outros) e em sua distribuição entre os neurônios e células gliais.

II.4.1.2. Ferro e a Doença de Alzheimer

Os níveis de ferro em cérebro acometidos com a DA são maiores que os encontrados em cérebros idosos saudáveis, entretanto, os mecanismos associados ao acúmulo de Fe continuam sem ser claramente explicados (BERG *et al.*, 2006). Apesar da etiologia da DA ainda ser desconhecida, existem evidências que indicam que o estresse oxidativo desempenha um importante papel na patologia da doença. Diferentes biometais redox ativos foram apontados como importantes para a ocorrência do estresse oxidativo e na modulação da A β , sendo o Fe o elemento que tem a maior participação no estresse oxidativo na DA. Foram encontradas deposições elevadas de Fe nas seguintes regiões do cérebro: hipocampo, amígdala, córtex e gânglios basais, que são as mais severamente afetadas pelo processo neurodegenerativo da doença (BARTZOKIS *et al.*, 2000). As placas senis e os emaranhados neurofibrilares, característicos na DA, demonstraram que podem acumular o Fe tornando-se importantes sítios para a atividade redox catalítica (SAYRE, 1997, SAYRE *et al.*, 2000, COLLINGWOOD *et al.*, 2005). Em estudos *in vitro*, a A β liga-se ao ferro (GARZON *et al.*, 1999) o que facilita a agregação da proteína (MANTHY *et al.*, 1993). A toxicidade resultante da agregação da A β pode ser reduzida por quelantes do ferro (BODOVITZ *et al.*, 1995). O ferro pode ter um impacto direto na formação das placas, pois afeta diretamente o processamento da APP (ROGERS *et al.*, 2002). Desta maneira, a habilidade da α -secretase de clivar a APP pode ser modulada pelo Fe (BODOVITZ *et al.*, 1995). *In vivo*, injeções de A β com Fe demonstrou causar mais danos aos neurônios do que injeções de A β apenas (HONDA, 2004).

Vários aspectos da homeostasia alterada de Fe têm sido observados. A ferritina, por exemplo, apresenta uma distribuição anormal em cérebros com DA (QUINTANA *et al.*, 2006), já as placas senis, demonstram possuir a transferrina (CONNOR *et al.*, 1992). Na DA a expressão da proteína-2, proteína reguladora do ferro, também é significativamente afetada (SMITH, 1998). Além disto, alterações em diversas outras

proteínas que estão diretamente ligadas ao metabolismo do ferro no cérebro também foram relatadas (KENNARD *et al.*, 1996, KIM *et al.*, 2001, SAMPIETRO *et al.*, 2001).

O papel exato que o Fe desempenha na patogênese da doença ainda não foi totalmente explicado. No entanto, há um crescente número de evidências que indicam que o estresse oxidativo é um dos primeiros eventos que ocorre na gênese da DA (HONDA *et al.*, 2004). Desta maneira, o Fe pode ter um papel fundamental na degeneração da DA.

II.4.2 Cobre

Em seres humanos, o cobre é um metal de transição essencial em diversas funções celulares incluindo a respiração celular, defesa de radicais livres, síntese de neurotransmissores, mielinização neuronal e metabolismo do ferro. Além do mencionado anteriormente, o cobre é essencial para o desenvolvimento dos tecidos conjuntivo, nervoso e ósseo. O Cu atua também como redutor nas enzimas superóxido dismutase, citocromo oxidase, lisil oxidase, dopamina hidroxilase e várias outras oxidases que reduzem o oxigênio molecular. No corpo de um humano adulto há cerca de 80 mg de Cu, sendo que as maiores concentrações estão no cérebro e fígado (FRAGA, 2005). A deficiência de Cu em seres humanos é rara, mas, quando existe, leva a ocorrência dos seguintes tipos de anemia: normocítica, hipocrômica, leucopenia e neuropenia (KANUMAKALA *et al.*, 2002). No entanto, o excesso de cobre torna-se tóxico, pois pode participar de reações que geram radicais livres, contribuindo, desta maneira, para o estresse oxidativo (BREWER, 2008).

II.4.2.1. Cobre e o Cérebro

No cérebro estão concentrados diversos metais, entre eles, o cobre, que está envolvido em diversas funções fisiológicas e metabólicas (BUSH, 2003), sendo o Cu essencial para o seu normal desenvolvimento e funcionamento. No cérebro de um adulto saudável, os níveis de cobre encontrados, cerca de 7% de todo o Cu corporal, é comparável aos níveis de Cu encontrados no fígado, cerca de 9%, sendo este o órgão principal da homeostase de Cu no organismo (GAGELLI *et al.*, 2006).

Íons livres de Cu podem interagir facilmente com o oxigênio dando início a uma cascata de reações que levam à geração de radicais hidroxilas que são altamente

prejudiciais. Devido a sua essencialidade para a função celular e sua natureza citotóxica no estresse oxidativo, o Cu é estritamente regulado no corpo (LI *et al.*, 2005). Assim, a ruptura da homeostase de Cu no cérebro, seja por deficiência ou excesso, pode levar ao inadequado funcionamento neurológico e a neurodegeneração. Devido a isto, existe um considerável número de pesquisadores sugerindo que a patogênese de distúrbios neurodegenerativos, como a DP, DA, Esclerose Lateral Amiotrófica familiar, doença Priônica e as doenças hereditárias de Menkes e de Wilson, envolvem um desequilíbrio na homeostase de Cu no cérebro (GAGGELLI *et al.*, 2006; MATÉS *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2012).

II.4.2.2. Cobre e a Doença de Alzheimer

O cobre não é o precursor da DA, porém sua interação com a APP e seus fragmentos pode contribuir para o desenvolvimento da DA. Devido a sua afinidade, o cobre é capaz de ligar-se a APP (KONG, 2008) e reduzir a Cu^{+2} (RUIZ, 1999). O processamento da APP em ambas as vias, amiloidogênica e não amiloidogênica (BELLINGHAM *et al.*, 2004b), e a sua localização (ACEVEDO *et al.*, 2011) são regulados pelos níveis de cobre intracelular. Microscopicamente, a deficiência de Cu pode acelerar a via amiloidogênica influenciando o processamento da APP (CATER, 2008). A deficiência de cobre na DA também pode comprometer o metabolismo energético e a defesa antioxidante (MAURER *et al.*, 2000, MARCUS *et al.*, 1998).

Assim, juntamente com inúmeras outras funções fisiológicas, a regulação da homeostase de cobre também foi atribuída à APP (NALIVAEVA *et al.*, 2013). Desta maneira, estudos mostram que, de fato, os níveis de APP podem modular os níveis de cobre cerebral (MAYNARD *et al.*, 2002, WHITE *et al.*, 1999b). Por outro lado, as evidências relacionadas ao papel da APP na toxicidade do cobre são conflitantes. Enquanto os níveis de APP em neurônios corticais de ratos foram correlacionados com uma maior sensibilidade ao cobre (WHITE *et al.*, 2002), neurônios hipocâmpais de ratos *in vivo* foram protegidos da toxicidade do cobre pela APP (CERPA *et al.*, 2004).

O peptídeo A β também demonstrou uma alta afinidade em se ligar ao cobre (ATWOOD *et al.*, 2000), tendo sido observadas também níveis elevados de Cu nas placas senis (LOVELL *et al.*, 1998). Os íons de Cu induzem a precipitação do peptídeo A β *in vitro* (ATWOOD *et al.*, 2000, FALLER *et al.*, 2013). Desta maneira, estas observações sugerem que o cobre desencadeia a formação de placas no cérebro (ATWOOD *et al.*,

2000, ROBERTS *et al.*, 2012). De fato, a deposição de A β começa nas sinapses glutamatérgicas (CATER, 2008) onde, tanto o cobre (HOPT *et al.*, 2003) quanto o peptídeo A β (TÕUGU *et al.*, 2011), são liberados durante a transmissão sináptica. Como o A β pode reduzir o Cu⁺² para Cu⁺, a formação ROS induzida pelo cobre pode estar envolvida na promoção da toxicidade do A β Os (ESKICI *et al.*, 2012). O aumento, *in vitro*, induzido pelo cobre na toxicidade da A β sugere um papel prejudicial do cobre na DA (HOWELLS *et al.*, 2012). Por outro lado, níveis reduzidos de cobre em pacientes com DA (LOEFFER *et al.*, 1996) e em modelos experimentais de ratos para a DA (Bayer, 2003) sugerem que um déficit local de cobre pode contribuir também para a neurodegeneração.

A ideia de que a privação de cobre pode estar relacionada com a DA tem suporte em estudos que mostram um aumento na qualidade de vida após a suplementação de cobre em modelos experimentais da DA em ratos (BAYER *et al.*, 2003) e pela melhora das funções cognitivas após a aplicação de Cu⁺² como fonte de cobre (CROUCH *et al.*, 2009). Assim, os altos níveis de cobre nas placas senis e os baixos níveis globais de cobre no cérebro acometido pela DA demonstraram que o Cu é redistribuído de forma anormal nas placas senis, fazendo com que os tecidos e células fiquem deficientes deste metal (MACREADIE, 2008, ROBERTS *et al.*, 2012). Sendo assim, equilíbrio homeostático entre o Cu e o A β é importante para as funções fisiológicas normais e a interrupção dos mecanismos homeostáticos resulta nas interações patológicas entre o A β e o Cu evidenciadas na DA.

II.4.3 Zinco

O zinco é um elemento traço essencial para muitos organismos vivos. Ele é o segundo metal de transição mais abundante depois do Fe, sendo também cofator para mais de 300 enzimas e metaloproteínas, regulando a transcrição de genes e também a reposta antioxidante (HAMBIDGE, 2000). Os níveis mais elevados de zinco no corpo humano são encontrados nos testículos, músculos, fígado e cérebro. Na infância, a deficiência de Zn afeta o desenvolvimento físico e mental, bem como o aprendizado (MIZUNO *et al.*, 2013). A deficiência de Zn causa também erosões gastrointestinais, lesões de pele e insuficiência cardíaca (KOZLOWSKI *et al.*, 2009). No entanto, o excesso de Zn suprime a absorção de Cu e Fe (FOSMIRE, 1990), promovendo a produção de ROS nas mitocôndrias, perturbando, assim, as atividades das enzimas metabólicas provocando

a ativação dos processos apoptóticos (WRIGHT *et al.*, 2007). A interrupção da homeostase de Zn foi associada à DA, ao trauma cerebral, isquemia cerebral, epilepsia e demência do tipo vascular (WRIGHT *et al.*, 2007, MIZUNO *et al.*, 2013). A distribuição deste metal em concentrações adequadas na membrana plasmática e nos compartimentos intracelulares previne os seres vivos dos efeitos tóxicos deste metal (KOZLOWSKI *et al.*, 2009).

II.4.3.1 Zinco e o Cérebro

No corpo humano, o zinco é encontrado principalmente no cérebro, com abundância particular no tronco encefálico auditivo, bulbo olfatório, amígdala, hipocampo e córtex (FREDERICKSON *et al.*, 1988 e 2000; WEISS *et al.*, 2000; SEKLER *et al.*, 2002). O Zn^{+2} desempenha um papel fundamental em uma infinidade de processos celulares, incluindo neurotransmissão, atividade enzimática, regulação de genes e manutenção estrutural e estabilização de proteínas (VALLEE *et al.*, 1993; CHOI *et al.*, 1998; FREDERICKSON *et al.*, 2005). Para os neurocientistas, o zinco não é apenas um micronutriente componente das proteínas, mas também é um sinal iônico. O Zn^{+2} move-se através dos canais iônicos da membrana plasmática e entre várias organelas (WEISS *et al.*, 2000, SENSI *et al.*, 2000).

Devido à sua função generalizada dentro dos neurônios, as concentrações intracelulares de zinco são rigorosamente reguladas, uma vez que a homeostase adequada do metal é crítica na manutenção do processamento celular normal. O zinco se liga com alta afinidade a um número muito grande de proteínas: cerca de 3000 genes humanos, ou 10% do genoma humano, foram identificados com codificação para proteínas de zinco (ANDREINI *et al.*, 2006). Enquanto a maioria (80-90%) do zinco presente no cérebro está ligada as proteínas de ligação do metal, a fração restante é armazenada dentro de vesículas sinápticas de uma grande subpopulação de neurônios excitatórios (COLE *et al.*, 1999; FREDERICKSON *et al.*, 2000). Assim, o Zn^{2+} armazenado seletivamente é liberado das vesículas pré-sinápticas deste tipo específico de neurônio que é encontrado, principalmente, no córtex cerebral de mamíferos. Estes neurônios liberadores de zinco também liberam glutamato. Desta maneira, o zinco parece modular a excitabilidade geral do cérebro através dos seus efeitos sobre o glutamato podendo, assim, modular a ativação de vários receptores de neurotransmissores, incluindo os receptores NMDA, AMPA, GABA e glicina (SMART *et al.*, 2004; PAOLETTI *et al.*, 2009 SENSI *et al.*, 2011), bem

como canais iônicos dependentes da tensão (GRAUERT *et al.*, 2014), além de modular a plasticidade sináptica (TIAN *et al.*, 2010).

Estudos que investigam os níveis de zinco no tecido cerebral sugerem que alterações destes níveis parecem ser específicas em algumas regiões. Nos estudos de CORRIGAN *et al.*, 1993; PANAYI *et al.*, 2002, foram observadas reduções nos níveis de zinco no neocórtex, giro temporal medial, tálamo e no hipocampo. Enquanto que nos estudos de THOMPSON *et al.*, 1988; SAMUDRALWAR *et al.*, 1995; DANSCHER *et al.*, 1997; RELIGA *et al.*, 2006, foram observados aumento nos níveis de zinco na amígdala, hipocampo, cerebelo e no giro temporal superior. Os resultados experimentais obtidos ainda são contraditórios quanto ao aumento e redução de Zn em algumas regiões encefálicas e, apoiam fortemente a hipótese de que a homeostase de zinco desregulada esteja envolvida na fisiopatologia da DA.

II.4.3.2 Zinco na Doença de Alzheimer

Entre os múltiplos papéis que o Zn desempenha na patogênese da DA, o mais estudado é o seu envolvimento na acumulação do A β . Estudos *post mortem*, utilizando diferentes técnicas de imagens para análise do zinco, demonstraram um aumento significativo na neuropil e nas placas senis presentes no cérebro de pacientes com DA quando comparados com grupos controle (DONG, 2003, MILLER *et al.*, 2006). Por outro lado, foi observado que a falta de zinco sináptico pode prevenir a deposição de A β (LEE *et al.*, 2002).

A produção de A β no cérebro se dá a partir do processamento da APP. Várias formas para o envolvimento do zinco no processamento de APP ou agregação da A β foram sugeridas. A síntese da APP é regulada por fatores de transcrição contendo zinco (GRILLI *et al.*, 1996). O zinco também participa do processamento da APP (LEE *et al.*, 2009) que depende da atividade de enzimas secretases (LING *et al.*, 2003, WILQUET *et al.*, 2004). A APP possui um sítio específico de ligação com o Zn, o que sugere que a mudança dos níveis intracelular de Zn pode influenciar a relação entre as secretases e a APP. O Zn pode inibir a atividade da α -secretase e aumentar as atividades das β -secretase e γ -secretase aumentando, assim, a produção do peptídeo A β (BUSH *et al.*, 1994 a,b). No entanto, vale a pena mencionar que o zinco não é o único fator que influencia o processamento da APP e seu papel não foi totalmente determinado.

Já foi bem estabelecido na literatura que as placas amiloides contêm concentrações aumentadas de cobre, ferro e zinco (YANG *et al.*, 2000, SMITH *et al.*, 1997). Enquanto o cobre e o ferro parecem ser os principais responsáveis pela toxicidade do A β através do estresse oxidativo (SMITH *et al.*, 1997, BUTTERFIELD *et al.*, 2007), o zinco desempenha um papel importante na agregação da A β , uma vez que o peptídeo demonstrou se ligar ao metal (BUSH *et al.*, 1994a). Além disto, não só a exposição ao zinco induz a agregação da A β em placas amiloides, mas as próprias placas são ricas em zinco (BUSH *et al.*, 1994b, ESLER *et al.*, 1996). Foi demonstrado, também, que o zinco sináptico pode promover a formação de oligômeros A β e seu acúmulo nas sinapses excitatórias (DESHPANDE *et al.*, 2007).

Sendo o estresse oxidativo um fator adicional que contribui para o avanço da DA (JOMOVA *et al.*, 2010), A β agregado torna-se tóxico através da produção de ROS. A sua ligação com metais modula a agregação e a produção de ROS e, portanto, a toxicidade. É proposto que Cu ligado a A β possa aumentar a toxicidade pela produção direta de ROS. Por outro lado, Zn²⁺ também mostrou desempenhar um papel protetor na geração de ROS competindo pela ligação de fibrilas A β com Cu²⁺ (FALLER *et al.*, 2009). Na presença de ambos os íons, a geração de ROS mostrou-se reduzida em relação ao Cu²⁺ sozinho (MAYES *et al.*, 2014), sugerindo, que a ligação Zn²⁺ limita a geração ROS tendo, assim, um efeito protetor (CUAJUNGCO *et al.*, 2000 e 2003).

II.5 Técnicas Analíticas e Análise Elementar

II.5.1 Fluorescência de Raios X

A Fluorescência de Raios X (XRF) é uma poderosa ferramenta analítica para a determinação de diversos elementos presentes em uma amostra. A fluorescência é produzida quando os fótons de energia suficientemente alta, e que são emitidos a partir de uma fonte de raios X, interagem com os átomos da amostra. Estes fótons são chamados de raios X primários. Os fótons de alta energia induzem a ionização dos elétrons das camadas mais internas, através do efeito fotoelétrico, criando, assim, vacâncias nas camadas mais internas. A rápida transição dos elétrons da camada externa para preencher a vacância criada pode causar a emissão dos chamados raios X característicos. A vacância em uma camada em particular resulta em uma cascata de transições de elétrons, todas relacionadas com a emissão de fótons com uma energia bem definida e correspondente à

diferença de energia entre as camadas atômicas envolvidas. Assim, os raios X característicos representam a assinatura eletrônica dos elementos químicos presentes na amostra estudada, permitindo, assim, a identificação destes elementos.

A espectroscopia por fluorescência de raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem uma amostra (KLOCKENKAMPER *et al.*, 2015). A intensidade dos raios X observados para um dado elemento varia conforme a quantidade deste elemento presente na amostra. A análise qualitativa envolve a identificação dos elementos presentes na amostra associando linhas características observadas. A análise quantitativa envolve a determinação da quantidade de cada elemento presente na amostra a partir da intensidade das linhas de raios X característicos. De forma bastante resumida, a análise por fluorescência de raios X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos pela amostra, e detecção desses raios X (ANJOS *et al.*, 2000).

II.5.2 Raios X Característicos

Para haver a emissão de raios X característicos em uma determinada amostra, um elétron deve ser ejetado de seu orbital atômico pela absorção de um fóton com energia suficiente para arrancá-lo. A energia deste fóton deve ser maior do que a energia com a qual o elétron está ligado ao núcleo do átomo, denominada energia de ligação eletrônica ou energia de corte de absorção.

Esta energia de ligação eletrônica pode ser calculada de modo aproximado, aplicando-se a teoria atômica de Bohr para o átomo de hidrogênio ou átomos hidrogenóides. Deste modo, a equação (2.1) permite o cálculo aproximado dessa energia para os elétrons das camadas K e L dos átomos de um elemento (NASCIMENTO FILHO, 2009).

$$E = \frac{me^4(Z-b)^2}{8\epsilon_0^2 h^2 n^2} \quad (2.1)$$

Onde:

E é energia de ligação eletrônica (J);

m é massa de repouso do elétron ($9,11 \times 10^{-31}$ kg);

e é carga elétrica do elétron ($1,60 \times 10^{-19}$ C);

Z é número atômico do elemento emissor de raios X;

b é constante de Moseley, com valores iguais a 1 e 7,4, para as camadas K e L, respectivamente;

ϵ_0 é a permissividade elétrica no vácuo = $8,85 \times 10^{-12} \frac{CN}{m^2}$;

h é a constante de Planck = $6,625 \times 10^{-34}$;

n é o número quântico principal do nível eletrônico ($n = 1$ para o nível K, $n = 2$ para o nível L, etc).

Substituindo-se na equação 2.1 os valores das constantes no sistema internacional de unidades, a energia de ligação (em joules) é dada por:

$$E = 2,18 \cdot 10^{-18} \frac{(Z-b)^2}{n^2} \quad (2.2)$$

A equação 2.2 pode ser reescrita em elétronvolts (eV):

$$E = 13,65 \frac{(Z-b)^2}{n^2} \quad (2.3)$$

Pode ser observado, nesta equação, que a energia de ligação para uma dada camada é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico Z do elemento. Assim, para “retirar” elétrons do nível K dos elementos Al, Fe e Te, de números atômicos 13, 26 e 52 respectivamente, são necessários 1,56; 7,11 e 31,81 keV, e 0,074; 0,72 e 4,61 keV para o nível L.

Para que ocorra a transição entre dois estados quânticos, é necessário que um elétron seja ejetado do átomo. Logo, é necessário que a energia da radiação que excita o átomo seja igual ou superior a energia de ligação do elétron ao átomo. Cada elétron em um átomo pode ser definido por quatro números quânticos. O primeiro desses números quânticos é o número quântico principal, n , que pode assumir todos os valores inteiros. Quando n é igual a 1, o nível é referido como o nível K; quando n é igual a 2, nível L, e assim por diante. O ℓ é o número quântico angular e pode assumir todos os valores de $n - 1$ até zero. O m é o número quântico magnético e pode assumir valores de $+\ell$ até $-\ell$.

Já s é o número quântico de rotação com valores de $\pm 1/2$. O momento total j de um elétron é dado pela soma vetorial dada pela equação 2.4:

$$j = \ell + s \quad (2.4)$$

Uma vez que nenhum elétron dentro de um determinado átomo pode ter o mesmo conjunto de números quânticos, uma série de níveis ou camadas podem ser construídas. O Quadro 2.1 apresenta as estruturas atômicas dos três primeiros níveis principais. A primeira linha, a linha K, possui um máximo de dois elétrons e ambos estão no nível 1 (orbital). Como o valor de j deve ser positivo, o único valor permitido é $+ 1/2$. Na segunda linha, a linha L, existem oito elétrons: dois no nível 2s e seis nos níveis 2p. Nesta instância j tem um valor de $1/2$ para o nível 1 e $3/2$ ou $1/2$ para o nível 2p, dando assim um total de três níveis de transição L possíveis. Estes níveis são referidos como L_1 , L_2 e L_3 , respectivamente.

Nível	Subnível	Números Quânticos			Número Máximo de Elétrons
		N	ℓ	j	
K		1	0	1/2	2
L	L_1	2	0	1/2	2
	L_2	2	1	1/2	2
	L_3	2	1	3/2	4
M	M_1	3	0	1/2	2
	M_2	3	1	1/2	2
	M_3	3	1	3/2	4
	M_4	3	2	3/2	4
	M_5	3	2	5/2	6
N	N_1	4	0	1/2	2
	N_2	4	1	1/2	2
	N_3	4	1	3/2	4
	N_4	4	2	3/2	4
	N_5	4	2	5/2	6
	N_6	4	3	5/2	6
	N_7	4	3	7/2	8

Quadro 2.1 – Os níveis e subníveis de energias de K a N.

Como exemplo de produção de um espectro de raios X, suponha que um elétron do nível K é inicialmente removido do átomo. Na primeira etapa do processo de desexcitação, um elétron do nível L, pode realizar um salto quântico para preencher a vacância. Isto produz uma vacância no nível L, que poderá ser preenchida por um elétron

no nível M, deixando uma vacância no nível M que por sua vez será preenchida por um elétron do nível N, o efeito resultante de cada etapa, é a passagem de uma vacância para um nível energético menor. Quando a vacância atinge o nível de mais baixa energia (banda de valência), ela é preenchida por um elétron qualquer, livre, do material. Deste modo, o átomo fica novamente neutro e no estado fundamental.

Assim, quando um elétron de um orbital interno é ejetado de um átomo, um elétron de um orbital de nível de energia superior é transferido para o orbital de energia mais baixa. Durante esta transição, um fóton pode ser emitido a partir do átomo. A energia do fóton emitido será igual à diferença de energia entre os dois orbitais ocupados pelo elétron que fez a transição. Devido ao fato de que a diferença de energia entre dois orbitais é específica em um determinado elemento, e sempre a mesma, ou seja, característica de um elemento particular, o fóton emitido quando um elétron se move entre estes dois níveis terá sempre a mesma energia.

A energia dos fótons emitidos será igual a diferença entre os dois estados quânticos envolvidos. Por exemplo: a transição entre um elétron do subnível L_3 para o nível K resulta na emissão de fótons chamados $K-L_3$. A energia deste fóton é expressa pela equação 2.5:

$$E_{K-L_3} = E_K - E_{L_3} \quad (2.5)$$

Nem todas as transições são permitidas entre estados quânticos, uma vez que existem transições proibidas (EISBERG & RESNIK, 1988). Pode-se selecionar, através de regras, as variações dos números quânticos:

$$\begin{pmatrix} \Delta \ell = \pm 1 \\ \Delta j = 0, \pm 1 \end{pmatrix} \quad (2.6)$$

São permitidas apenas as transições que estão de acordo com as regras representadas pela equação 2.6. O nível L , por exemplo, possui 3 subníveis L_1 , L_2 e L_3 . Apenas as transições $K-L_2$ e $K-L_3$ ocorrem. A transição $K-L_1$ é proibida ($\Delta \ell = 0$ e $\Delta j = 0$).

As transições entre estados quânticos são representadas em termos de um diagrama de níveis de energia na Figura 2.9.

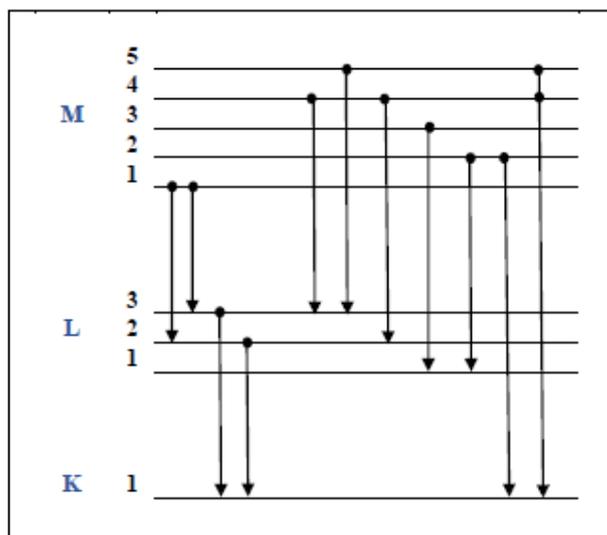


Figura 2.9 - Diagrama de energia com possíveis transições dos elétrons (COSTA, 2003).

II.5.3 Emissão de Elétron Auger e de Fluorescência de Raios X

O átomo fica excitado quando libera um elétron orbital. Os elétrons de níveis mais energéticos vão preenchendo as vacâncias. A energia na transição é liberada de duas formas (COSTA, 2003):

- a) Como um fóton na forma de Fluorescência de Raios X; e
- b) Como um elétron na forma de Elétron Auger (Figura 2.10).

Ao ter um elétron ejetado de uma camada interna, o átomo se rearranja para preencher a vacância deixada. Neste processo, a energia correspondente ao rearranjo pode ser liberada em forma de fóton de fluorescência, mas também pode ser liberada com a ejeção de um elétron. Este processo é conhecido como Efeito Auger e o elétron ejetado conhecido como Elétron Auger.

O Efeito Auger é mais comum para átomos de número atômico de baixo ($Z < 20$) devido a menor energia de ligação dos elétrons. Tem como consequência a diminuição na intensidade de uma dada série de linhas em relação ao número previsto de vacâncias criadas, logo, o Efeito Auger e a fluorescência são efeitos concorrentes e um terá predominância em relação ao outro conforme o número atômico Z do material absorvedor. Assim, com a emissão de elétron Auger o número de raios X característicos produzidos é menor do que o esperado (KLOCKENKAMPER *et al.*, 2015).

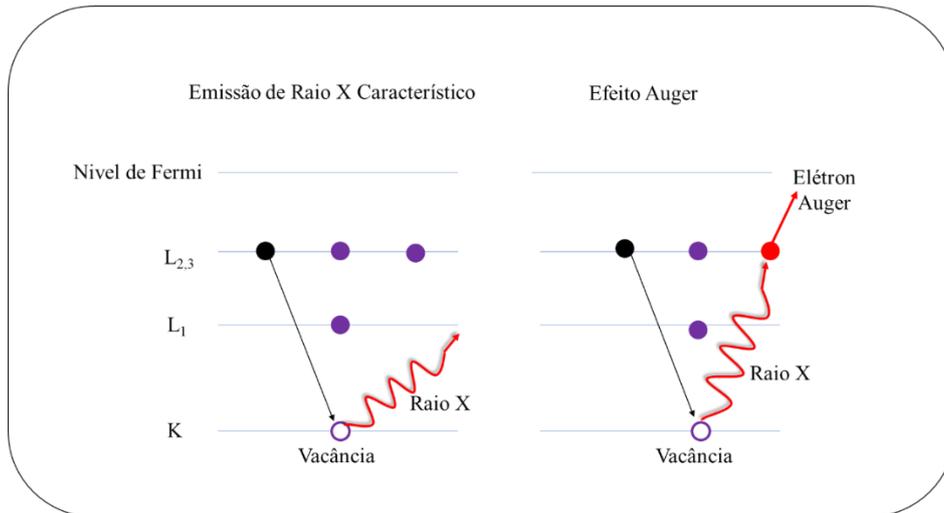


Figura 2.10 - Representação esquemática do Efeito Auger.

O rendimento de fluorescência ω é definido como a probabilidade para que o fóton produzido seja liberado do átomo sem ser reabsorvido gerando um elétron Auger. Assim, ω pode ser representado como (NASCIMENTO, 1999):

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \quad (2.7)$$

$$n_p = n_s + n_A \quad (2.8)$$

Onde:

n_s é o número de fótons produzidos por fluorescência de raios X;

n_p é o número de fótons que são produzidos devido às vacâncias nos níveis e subníveis atômicos;

n_A é o número de fótons que são reabsorvidos dentro do átomo.

O rendimento de fluorescência para linha K é dado pelo número de fótons, n_k , emitidos como fluorescência de raios X para todas as linhas K , dividindo pelo número de fótons criados, N_k , devido as transições entre os estados quânticos. Assim, tem-se:

$$\omega_K = \frac{n_{K-L_2} + n_{K-L_3} + n_{K-M_3} + \dots}{N_K} = \frac{\sum n_K}{N_K} \quad (2.9)$$

É possível obter o rendimento de fluorescência, ω_L , para as linhas L tendo três diferentes valores: ω_{L_1} , ω_{L_2} e ω_{L_3} .

Podemos definir, então, o rendimento de fluorescência como o número de raios X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em uma dada camada como ilustra a Figura 2.11.

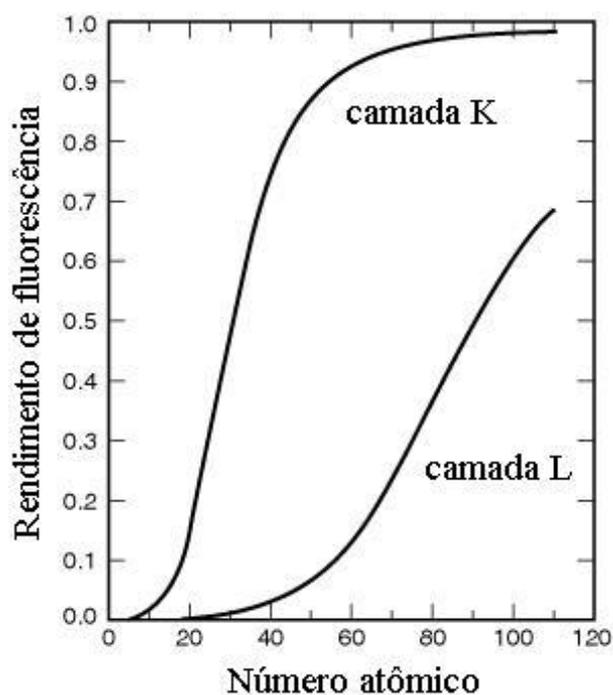


Figura 2.11 – Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico (Z) (NASCIMENTO, 1999).

II.5.4 Razão Salto/Absorção

A probabilidade de a radiação incidente em uma amostra retirar elétrons de um dado nível, e não de qualquer outro nível está fortemente ligada com a fração da radiação que é absorvida naquele nível,

$$p_{\text{nível}} = \frac{\text{absorção da radiação num nível específico}}{\text{absorção da radiação em todos os níveis}} \quad (2.10)$$

para linha K, tem-se,

$$p_K = \frac{r_{k-1}}{r_k} \quad (2.11)$$

Onde:

$$r_K = \frac{\tau_k + \tau_{L_1} + \tau_{L_2} + \tau_{L_3} + \tau_{M_1} + \dots}{\tau_{L_1} + \tau_{L_2} + \tau_{L_3} + \tau_{M_1} + \dots} \quad (2.12)$$

Onde:

τ_k é a seção de choque do efeito fotoelétrico;

r_k é a razão salto/absorção (é definida em função da seção de choque de absorção fotoelétrica).

No caso da linha L,

$$p_L = \frac{r_L - 1}{r_L} \quad (2.13)$$

Na prática, a razão salto/absorção é calculada pela seguinte relação:

$$r = \frac{\tau_{E_{\text{absorção}} - \Delta E}}{\tau_{E_{\text{absorção}} + \Delta E}} \quad (2.14)$$

A fração de radiação incidente que leva a emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada por uma probabilidade de excitação que é produto de três outras probabilidades (LACHANCE & CLAISSE, 1995):

$$p_{E_l} = p_{\text{nível}} \cdot p_{\text{linha}} \cdot p_{\text{fluorescência}} \quad (2.15)$$

Onde:

$p_{\text{nível}}$ é a probabilidade que a radiação incidente retire elétrons de um dado nível quântico. Pode ser o nível K, L, M, N, O, etc;

p_{linha} é a probabilidade que uma determinada linha seja emitida dentro de sua série.

Para um elétron retirado do nível K podemos ter as seguintes transições do nível

L: $K-L_2$ e $K-L_3$;

$p_{fluorescência}$ é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X ao invés de elétron Auger a partir de uma transição realizada entre dois estados quânticos.

II.5.5 Intensidade Relativa das Linhas de Raios X Característicos

A intensidade relativa entre a linha específica e as outras linhas na série fornecem a probabilidade para que uma determinada linha específica seja emitida dentro de uma série. Assim, a probabilidade que a linha $K-L_{2,3}$, seja emitida em relação as outras linhas K é dada pelo fator:

$$f_{K-L_{2,3}} = \frac{I_{K-L_{2,3}}}{\sum I_{todasaslinhasK}} \quad (2.16)$$

Experimentalmente a Linha $K-L_{2,3}$ é, aproximadamente, duas vezes mais intensa que a linha $K-L_2$. A intensidade relativa para linha $K-L_{2,3}$ é dada por:

$$f_{K-L_{2,3}} = \frac{I_{K-L_{2,3}}}{I_{K-L_{2,3}} + I_{K-M_3}} \quad (2.17)$$

Podem-se desprezar as intensidades das demais linhas que são muito pequenas.

A probabilidade de emissão da série $L_3-M_{4,5}$ em relação as outras linhas é:

$$f_{L_3-M_{4,5}} = \frac{I_{L-M_{4,5}}}{\sum I_{todasaslinhasL}} \quad (2.18)$$

II.5.6 Quantificação por Fluorescência de Raios X (XRF)

Para a análise quantitativa por XRF é necessário relacionar as intensidades fluorescentes dos elementos medidos na amostra com suas respectivas concentrações (VAN GRIEKEN, *et al.*, 2002). Cada átomo de um determinado elemento i tem a mesma probabilidade de ser excitado por um feixe primário de fótons, por isto, para íons ou átomos isolados, é esperada uma relação linear entra a intensidade dos raios X característicos. Para este caso é considerada a equação 2.19.

$$I_i = K_i \cdot W_i \quad (2.19)$$

Onde:

I_i é a medida da intensidade da radiação fluorescente do elemento i ;

W_i corresponde a fração do elemento na amostra;

K_i é a constante de proporcionalidade

II.5.6.1 A Intensidade da Radiação Fluorescente

Para a excitação monoenergética há uma relação simples entre a intensidade da radiação fluorescente de uma linha característica (K_α e L_α) e a concentração W_i de um elemento i em uma amostra. A concentração elementar em uma amostra pode ser obtida assumindo-se que a distribuição dos elementos i em todo o volume da amostra é uniforme. Supondo que a amostra possui uma massa específica ρ_m e espessura d , sendo composta por n elementos, com diferentes concentrações, distribuído uniformemente por todo o volume da amostra (ANJOS *et al.*, 2000; SIMABUCO, 2000).

A Figura 2.12 mostra uma representação esquemática da geometria de excitação XRF.

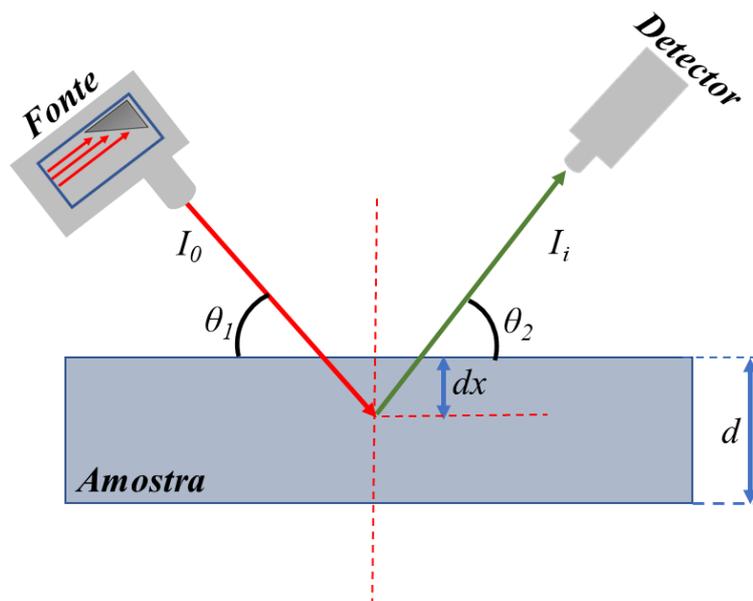


Figura 2.12 - Representação esquemática da emissão de fluorescência de raios X.

Supondo que um feixe de raios X, colimado, com intensidade I_0 e energia E_0 , incide sobre a superfície da amostra num ângulo θ_1 . Em uma distância x da superfície, num elemento infinitesimal dx , o feixe interage com um elemento i , produzindo a liberação de um elétron do orbital $1s$. Consequentemente, ocorrerá a emissão de XRF com intensidade I_i , isotropicamente, e energia E_i . Um detector posicionado, segundo uma direção θ_2 em relação a superfície da amostra, detectará a radiação emitida pelo elemento i nesta direção.

A intensidade I_0 da radiação incidente, com energia E_0 , alcança a camada dx no interior da amostra é dada pela equação 2.20:

$$I_1 = I_0 \cdot \Omega_1 \left(\exp \left[-\mu_m(E_0) \cdot \rho_m \cdot \frac{x}{\text{sen}(\theta_1)} \right] \right) \quad (2.20)$$

Onde:

I_1 é a intensidade da radiação que alcança a camada dx ;

I_0 é a intensidade da radiação que incide na amostra;

Ω_1 é o ângulo sólido relativo à fonte;

ρ_m é a massa específica da amostra;

$\mu_m(E_0)$ é o coeficiente de absorção de massa da amostra para a energia E_0 dos fótons da radiação incidente;

θ_1 é o ângulo que o feixe incidente I_0 , com energia E_0 , faz com a amostra.

O número de interações fotoelétricas dI_{fot} , na camada dx devido ao elemento i é dado por:

$$dI_{fot} = I_1 \cdot \tau_i(E_0) \cdot \rho_i \cdot dx \quad (2.21)$$

Onde:

ρ_i é a massa específica do elemento i ;

$\tau_i(E_0)$ é a seção de choque.

A seção de choque para o efeito fotoelétrico representa a contribuição de todas às linhas ($K, L_1, L_2, L_3, M_1, \dots$). Então se tem:

$$\tau_i(E_0) = \tau_{i,K}(E_0) + [\tau_{i,L_1}(E_0) + \tau_{i,L_2}(E_0) + \tau_{i,L_3}(E_0)] + [\tau_{i,M_1}(E_0) + \dots] \quad (2.22)$$

O número de fótons que serão emitidos em uma determinada linha, neste caso a linha K , é dado por:

$$dI_{i,r} = (dI_{fot.}) \cdot \left(\frac{r_{K-1}}{r_K} \right) \quad (2.23)$$

Onde $\left(\frac{r_{K-1}}{r_K} \right)$ (eq. 2.11) é a probabilidade de a radiação incidente retirar elétrons da linha K do elemento i .

A vacância produzida no nível K pode ser preenchida por várias linhas K ($K-L_2, K-L_3, K-M_1, \dots$). O número de transições para as linhas $K-L_{2,3}$ será:

$$dI_{f_{K-L_{2,3}}} = (dI_{i,r}) \cdot (f_{K-L_{2,3}}) \quad (2.24)$$

O fator $(f_{K-L_{2,3}})$ foi encontrado na equação 2.16.

Já o número de transições $K-L_{2,3}$ que ocorrem e produzem fluorescência de raios X ao invés de elétrons Auger é dado por:

$$dI_{\omega_{K-L_{2,3}}} = (dI_{f_{K-L_{2,3}}}) \cdot (\omega_{K-L_{2,3}}) \quad (2.25)$$

Onde

$\omega_{K-L_{2,3}}$ é o rendimento da fluorescência de raios X (equação 2.9)

A radiação fluorescente, produzida em dx , é emitida isotropicamente e chega ao detector dentro de um ângulo sólido Ω_2 com intensidade dada por:

$$dI_{K-L_{2,3}} = \Omega_2 \cdot dI_{\omega_{K-L_{2,3}}} \cdot \varepsilon(E_i) \left[\exp \left\{ -\mu_m(E_i) \cdot \rho_m \cdot \frac{x}{\text{sen}(\theta_2)} \right\} \right] \quad (2.26)$$

Onde:

ρ_m é a massa específica da amostra;

$\varepsilon(E_i)$ é a eficiência do detector para a energia da radiação fluorescente emitida pelo elemento i ;

$\mu_m(E_i)$ é o coeficiente de absorção de massa da amostra para a energia da radiação fluorescente produzida por um elemento i na amostra;

θ_2 é o ângulo que o feixe refletido I_i , com energia E_i , faz com a amostra.

A intensidade da radiação fluorescente, para a linha $K-L_{2,3}$, emitida por um elemento i na camada dx , é, então, dada por:

$$\begin{aligned} dI_{i,K-L_{2,3}} &= (I_0 \cdot \Omega_1 \cdot \Omega_2) \left[\tau_i(E_0) \cdot \omega_{i,K-L_{2,3}} \cdot f_{i,K-L_{2,3}} \cdot \left(\frac{r_K - 1}{r_K} \right) \right] \cdot \rho_i \cdot \varepsilon(E_i) \cdot \\ &\left[\exp \left\{ -\mu_m(E_0) \cdot \rho_m \cdot \frac{x}{\text{sen}(\theta_1)} \right\} \right] \cdot \left[\exp \left\{ -\mu_m(E_0) \cdot \rho_m \cdot \frac{x}{\text{sen}(\theta_2)} \right\} \right] dI_{i,K-L_{2,3}} \\ &= (I_0 \cdot \Omega_1 \cdot \Omega_2) \left[\tau_i(E_0) \cdot \omega_{i,K-L_{2,3}} \cdot f_{i,K-L_{2,3}} \cdot \left(\frac{r_K - 1}{r_K} \right) \right] \cdot \rho_i \cdot \varepsilon(E_i) \cdot \\ &\left[\exp \left\{ -\mu_m(E_0) \cdot \rho_m \cdot \frac{x}{\text{sen}(\theta_1)} \right\} \right] \cdot \left[\exp \left\{ -\mu_m(E_0) \cdot \rho_m \cdot \frac{x}{\text{sen}(\theta_2)} \right\} \right] \quad (2.27) \end{aligned}$$

A equação 2.26 pode ser reescrita agrupando em um único termo K_i os parâmetros físicos que são responsáveis pela produção de fluorescência de raios X:

$$K_i = \left[\tau_i(E_0) \cdot \omega_{i,K-L_{2,3}} \cdot f_{i,K-L_{2,3}} \cdot \left(\frac{r_K - 1}{r_K} \right) \right] \quad (2.28)$$

Na equação 2.27 o termo K_i é denominado de **constante dos parâmetros fundamentais** e depende, apenas, das propriedades físicas da produção de fluorescência de raios X.

Os termos I_0 , Ω_1 e Ω_2 são constantes que não dependem da concentração elementar na amostra. São função, apenas, da intensidade da fonte de excitação e da geometria do sistema fonte-detector. Portanto, é conveniente agrupá-los em outra variável.

$$G = I_0 \cdot \Omega_1 \cdot \Omega_2 \quad (2.29)$$

A variável G é chamada de **fator geometria do sistema**.

Os coeficientes de absorção de massa para a energia do feixe incidente (E_0) e feixe emergente (E_i) podem ser representados por:

$$\chi_i(E_0, E_i) = \frac{\mu_m(E_0)}{\text{sen}(\theta_1)} + \frac{\mu_m(E_i)}{\text{sen}(\theta_2)} \quad (2.30)$$

O termo $\chi_i(E_0, E_i)$ pode ser entendido como o **coeficiente de absorção de massa total**.

Substituindo as equações 2.28, 2.29 e 2.30 na equação 2.27, temos que:

$$dI_{i,K-I_{2,3}} = G \cdot K_i \cdot \rho_i \cdot \varepsilon(E_i) \cdot [\exp\{-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot x\}] dx \quad (2.31)$$

Integrando-se a equação 2.31 em toda a espessura, de 0 a d , tem-se:

$$I_{i,K-I_{2,3}} = G \cdot K_i \cdot \rho_i \cdot \varepsilon(E_i) \cdot \int_0^d [\exp\{-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot x\}] dx \quad (2.32)$$

A intensidade da radiação fluorescente de um elemento i na amostra será:

$$I_{i,K-I_{2,3}} = G \cdot K_i \cdot \rho_i \cdot \varepsilon(E_i) \cdot \frac{1}{\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m} \cdot [1 - \exp\{-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot d\}] \quad (2.33)$$

Onde:

$\rho_m \cdot d$ é a densidade superficial da amostra;

$\frac{\rho_i}{\rho_m} = W_i$, é a concentração do elemento i na amostra em $[\mu g \cdot g^{-1}]$ ou $[g \cdot kg^{-1}]$.

O produto $[G \cdot K_i \cdot \varepsilon(E_i)]$ pode ser representado por outra variável:

$$S_i = G \cdot K_i \cdot \varepsilon(E_i) \quad (2.34)$$

O termo S_i é denominado de **sensibilidade do sistema** para o elemento i na amostra. É função dos parâmetros fundamentais, do fator de geometria associado ao arranjo experimental, e da eficiência de detecção. Assim a equação 2.33 pode ser reescrita como:

$$I_i = S_i W_i \cdot \frac{[1 - \exp\{-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot d\}]}{\chi_i(E_0, E_i)} \quad (2.35)$$

Na equação 2.36, a razão apresentada é denominada de fator de absorção, A , da radiação na amostra para o elemento de interesse:

$$A(E_0, E_i) = \frac{[1 - \exp\{-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot d\}]}{\chi_i(E_0, E_i)} A(E_0, E_i) = \frac{[1 - \exp\{-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot d\}]}{\chi_i(E_0, E_i)} \quad (2.36)$$

Assim a equação 2.35, ainda pode ser reescrita como:

$$I_i = S_i \cdot W_i \cdot A(E_0, E_i) \quad (2.37)$$

A partir da equação 2.37 podemos chegar na equação da concentração de um elemento,

$$W_i = \frac{I_i}{S_i} \cdot \frac{1}{A(E_0, E_i)} \quad (2.38)$$

Outro método para o cálculo da concentração elementar usando XRF faz uso das chamadas curvas de calibração, que relacionam as intensidades fluorescentes dos elementos com suas respectivas concentrações. Deste modo, os efeitos de matriz são eliminados ou medidos. Para a construção da curva de calibração é necessário um conjunto de amostras certificadas (padrões) de composição na mesma faixa de concentrações da amostra desconhecida.

Supondo uma amostra certificada (com concentrações elementares conhecidas) com uma matriz semelhante à amostra que se deseja estudar, de acordo com a equação 2.37, podemos escrever:

$$I_{i,p} = S_{Ga} \cdot W_{i,p} \cdot A \quad (2.39)$$

Onde:

$I_{i,p}$ é a intensidade produzida pelo elemento i no padrão;

S_{Ga} é a sensibilidade do sistema para o Ga;

$W_{i,p}$ é a concentração do elemento padrão i na amostra;

A representa o fator de absorção do padrão para o elemento i .

Para amostras consideradas finas, ou filmes finos, o termo $\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot d$ na equação 2.36 tende a zero, ou seja, $\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot d \rightarrow 0$ e o termo $e^{-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot d} \rightarrow 1 - \chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_m \cdot d$ e, nesta condição, o fator de absorção tem valor unitário, ou seja, $A = 1$ (BECKHOFF *et al.*, 2005) assim as equações 2.37 e 2.39 podem ser reescritas, respectivamente, da forma a seguir:

$$I_i = S_i \cdot W_i \quad (2.40)$$

$$I_{i,p} = S_{Ga} \cdot W_{i,p} \quad (2.41)$$

A partir das equações 2.40 e 2.41, obtemos a equação 2.42:

$$\frac{I_i}{I_{i,p}} = \frac{S_i}{S_{Ga}} \frac{W_i}{W_{i,p}} \quad (2.42)$$

Onde:

$\frac{I_i}{I_{i,p}} = I_r$ é chamada de intensidade relativa;

$\frac{S_i}{S_{Ga}} = S_r$ é chamada de sensibilidade relativa.

Desta maneira, podemos obter a concentração do elemento i na amostra utilizando a equação 2.43:

$$W_i = W_{i,p} \cdot \frac{I_r}{S_r} \quad (2.43)$$

II.5.7 Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF)

A técnica TXRF permite a análise de elementos presentes na amostra em baixas concentrações, na faixa de parte por milhão (ppm ou mg.mL⁻¹) (MOREIRA, 2006). A técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total é um caso especial da Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF). Consiste, basicamente, na emissão da radiação incidente a ângulos muito rasos sobre a superfície refletora de forma a se obter a reflexão total. No intuito de diminuir o espalhamento e a fluorescência dos elementos do material refletor, a técnica de TXRF busca um ângulo de incidência em que todo feixe incidente seja refletido, havendo, conseqüentemente, menor interação possível entre a radiação incidente e o material do refletor.

Um feixe de radiação monoenergético, ao passar por um meio (ar ou vácuo) e atingir uma superfície plana de um dado material, poderá sofrer refração (o feixe penetra no material) ou reflexão (o feixe é refletido pela superfície) em um ângulo de emergência igual ao de incidência. A ocorrência de um ou de outro processo dependerá da energia da radiação incidente, da densidade eletrônica do material, e do ângulo de incidência da radiação. Há um ângulo, denominado ângulo crítico (Φ_{crit}) (AIGINGER, 1991, PRANGE & SCHWENKE, 1982), no qual a radiação não é refratada e tampouco refletida, permanecendo no plano da interface. Este ângulo crítico pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\Phi_{crit} = \frac{99,1}{E} \left(\frac{\rho \cdot Z}{A} \right)^{1/2} \quad (2.44)$$

Onde:

E é a energia da radiação incidente;

P é a densidade do material;

Z é o número de elétrons em um átomo ou molécula;

A é o átomo-grama ou molécula-grama.

Portanto, se um feixe de radiação monoenergético incidir em uma superfície com ângulo maior que o crítico, ocorrerá refração e, se for menor, ocorrerá reflexão.

Logo, a teoria de TXRF é baseada no fenômeno óptico de reflexão total como sugere o nome. A excitação da amostra é feita pela incidência do feixe Raios X por um ângulo de miliradianos. Este ângulo está abaixo do ângulo crítico do material refletor, quando ocorre a reflexão total, e o feixe primário colimado é totalmente refletido (KLOCKEMKAMPER *et al.*, 2015).

A TXRF surgiu para solucionar, principalmente, a baixa sensibilidade da XRF convencional. Enquanto o ângulo de incidência e o de reflexão são aproximadamente $45^\circ/45^\circ$ na EDXRF, na TXRF são de $0,1^\circ/90^\circ$ conforme mostrado na Figura 2.13. Esta diferença na geometria faz com que ocorra a reflexão total dos raios X. Como o feixe de radiação atinge a amostra com um ângulo muito pequeno, a interação com o substrato é minimizada. A radiação emitida é detectada perpendicularmente e bem próxima da amostra (3 a 5 mm), aumentando a eficiência da detecção dos raios X, uma vez que a razão pico/background é maximizada (NASCIMENTO-FILHO, 1999).

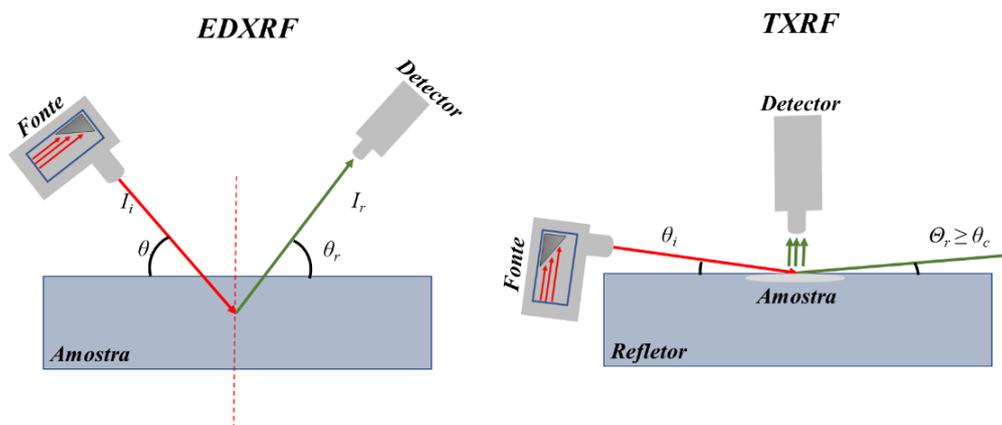


Figura 2.13 – Configuração dos sistemas de fluorescência de raios X por EDXRF e TXRF.

A TXRF oferece as seguintes vantagens em relação a EDXRF:

- ✓ Excitação da amostra por interferência dos fótons dos feixes incidente e refletido;
- ✓ Necessidade de pouca quantidade de amostra a ser coletada e mensurada (na ordem de μL ou μg);
- ✓ Não destruição da amostra;

- ✓ Para a geometria, é possível posicionar o detector perto da superfície refletora, onde, no centro, está localizada a amostra. Isto resulta em um grande ângulo sólido para a detecção dos sinais de fluorescência;
- ✓ Redução do background;
- ✓ Pequena distância entre a amostra e o detector; e
- ✓ Limites de detecção em nível de ppm.

II.5.8 Limite de Detecção

O Limite de Detecção (LD) é a menor quantidade que poder ser discriminada estatisticamente em relação ao background. O limite de detecção pode ser descrito como:

$$LD = \frac{3\sqrt{N_B}}{N_i} W_i \quad (2.45)$$

Onde:

N_B é a intensidade relativa ao background em um intervalo de tempo t ;

N_i é a intensidade da radiação fluorescente relativa ao elemento i no intervalo de tempo t ;

W_i é a concentração do elemento i na amostra.

Considerando-se algumas relações da seção (análise quantitativa), tem-se o LD em relação ao tempo de irradiação e a concentração e intensidade de fluorescência do padrão interno (COSTA, 2003):

$$LD = 3 \frac{\sqrt{I_B}}{S_{ri}} \cdot \frac{W_i}{I_p} \quad (2.45)$$

Onde:

I_B é a intensidade do background;

t é o tempo de irradiação;

S_{ri} é a sensibilidade relativa para o elemento;

I_p é a intensidade do padrão interno.

O limite de detecção é um método utilizado para comparar diferentes técnicas analíticas. Normalmente se determina o limite de detecção para alguns elementos e por extrapolação (curva LD) determina-se o LD para os demais elementos.

O LD para TXRF é normalmente da ordem de (ng/g), porém, em algumas amostras pré-concentradas, pode se obter LDs da ordem de (pg/g) (COSTA, 2003).

De modo geral, os limites de detecção para a técnica de TXRF são bem menores que aqueles da fluorescência convencional devido, principalmente, aos seguintes fatores:

- ✓ A baixa intensidade do *continuum*, devido a reduzida transferência de energia ao suporte da amostra em relação à EDXRF;
- ✓ O fluxo de radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, é muito mais efetivo do que na EDXRF; e
- ✓ A distância entre a amostra e o detector de Si é menor que na EDXRF, aumentando, portanto, a eficiência de detecção dos raios X característicos.

Estes dois últimos fatores fazem com que a sensibilidade elementar tenha valores superiores aqueles da EDXRF e, juntamente com o *continuum* inferiores, resulta em limites de detecção mais satisfatórios para TXRF.

II.5.9 Microfluorescência de Raios X (μ XRF)

A Microfluorescência de Raios X (μ XRF) é uma variante da XRF convencional diferenciando-se, principalmente, nas dimensões e geometria do feixe. É baseada na excitação localizada de uma área microscopicamente pequena (na ordem de μm) na superfície de uma amostra, fornecendo informações da distribuição espacial de elementos majoritários e minoritários no material de estudo. Por este motivo, a μ XRF é uma técnica bastante atrativa para a análise local e para o mapeamento elementar em vários tipos de materiais (BERNASCONI, 1994)

As informações da μ XRF são obtidas dividindo-se a superfície a ser analisada em pixels (áreas), onde a dimensão desses pixels é determinada pela dimensão do feixe, Figura 2.14.

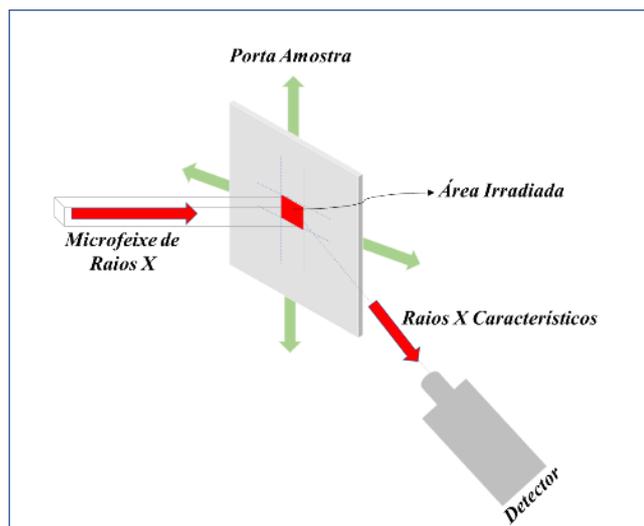


Figura 2.14 – Esquema simplificado da análise por μXRF.

O feixe de radiação incide em cada pixel e induz a emissão de fótons de fluorescência de raios X. Um sistema apropriado de detecção coleta estes fótons de fluorescência que contém a composição química desta área da amostra, Figura 2.15. A amostra é então, movida por motores controlados através de um computador e, assim, se obtém informações de outras áreas da amostra.

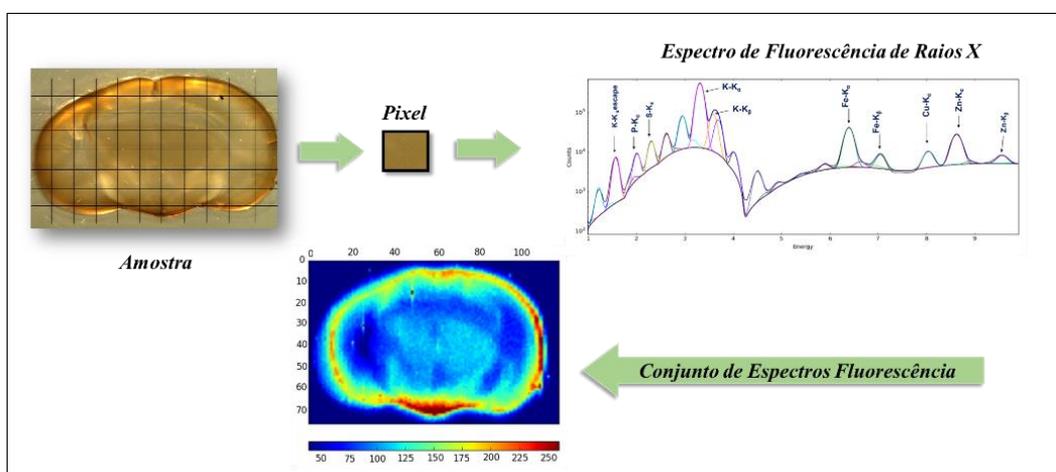


Figura 2.15 – Representação esquemática da obtenção de imagem por μXRF.

A μXRF é um poderoso método para análise em amostra biológicas, tendo as seguintes vantagens: baixo limite de detecção ($0,01 \mu\text{gg}^{-1}$), pequeno dano térmico, e as medidas podem ser realizadas no ar (EKTASSABI *et al.*, 1999).

A utilização da radiação síncroton em μXRF permite maior sensibilidade para a análise de concentrações muito baixas e possibilita estudar amostras menores (da ordem

de μm) de modo que, seria impossível através de uso de outras fontes. A Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncroton (μSRXRF) é uma ferramenta muito poderosa na análise elementar ao nível de micrômetros (JANSSENS *et al.*, 2000).

II.5.10 Radiação Síncroton

A luz síncroton é uma fonte de luz brilhante que os cientistas podem usar para reunir informações sobre as propriedades estruturais e químicas dos materiais em nível molecular.

Um síncroton produz luz usando poderosos eletroímãs e ondas de radiofrequência para acelerar os elétrons quase à velocidade da luz em um anel de armazenamento. Este anel é um polígono feito de secções retas inclinadas em conjunto com imãs de flexão. À medida que o elétron passa através de cada imã, perde energia, sob a forma altamente concentrada (KLOCKENKAMPER *et al.*, 2015).

Esta luz, composta por diferentes espectros de luz tais como infravermelho, ultravioleta e raios X, pode, então, ser canalizada para fora da parede do anel de armazenamento para as estações experimentais (linhas de luz) onde os pesquisadores escolhem o comprimento de onda desejado para estudar suas amostras.

Este instrumento pode ser usado para sondar a matéria e analisar uma variedade de processos físicos, químicos, geológicos e biológicos.

A utilização de uma fonte de radiação síncroton permite alcançar limites de detecção mais baixos do que quando se utiliza um tubo de raios X de alta potência (KLOCKENKAMPER *et al.*, 2015, CASTRO, 2001).

As vantagens de se utilizar este tipo de radiação são as seguintes:

- ✓ Alto brilho espectral de um feixe de luz síncroton resulta em raios X primários com intensidades de 3 a 5 vezes maiores que as obtidas com tubos convencionais de raios X;
- ✓ Uma vez que a luz síncroton cobre uma larga faixa de energia no espectro de raios X, torna-se altamente adequada para o tunelamento de energia. Utilizando-se um cristal de multicamadas para selecionar uma faixa particular de energia pode ser facilmente ajustada para otimizar a energia de excitação dos elementos desejados; e
- ✓ O “background” espectral já reduzido pela TXRF pode ser reduzido ainda mais devido à polarização da luz síncroton.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

III. 1. Preparação de Amostras

III.1.1 Animais

Foram utilizados 90 camundongos suíços de ambos os sexos, 60 machos e 30 fêmeas, com 3 meses de idade. Os animais foram agrupados em caixas, com 5 animais cada uma, com acesso livre a alimento (Nuvilab CR, Quimtia®, PR, Brasil) e água filtrada. As caixas foram armazenadas no biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com controle de umidade, temperatura e ciclos de 12 horas de luminosidade e 12 horas sem luminosidade. Todos os protocolos foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), protocolo #IBqM 129/2015.

III.1.2 Injeção Intracerebroventricular (icv) de A β Os em Camundongos

O A β Os foi injetado através da técnica *free hand* descrita por (FIGUEIREDO *et al.*, 2013, LOURENÇO *et al.*, 2013). Para as injeções icv de A β Os ou veículo, os animais foram anestesiados por 7 minutos com 2,5% de isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil), utilizando um sistema de vaporização. Os camundongos foram cuidadosamente manipulados e receberam uma única injeção icv de A β Os ou veículo no ventrículo lateral direito, com uma agulha gengival de 2,5 mm de comprimento, inserida a 1 mm a direita a partir da linha média do crânio, equidistante de cada olho, e 1 mm posterior à linha desenhada pela base anterior dos olhos como ilustrado na Figura 3.1. Foram feitas injeções com 3 μ L de A β Os numa concentração de 10 pmol e 100 pmol nos grupos com a DA experimental e um volume equivalente de veículo no grupo controle.

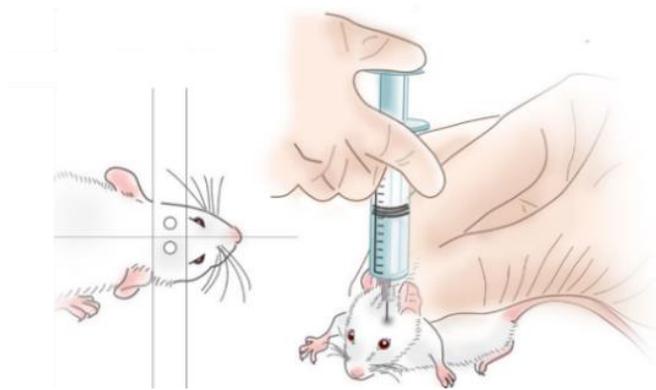


Figura 3.1 – Injeção intracerebroventricular (icv).

III. 1.3 Preparação de Amostras e Padrões

III. 1.3.1 Preparação de Amostras para a Técnica de TXRF

Sete dias depois da injeção icv, 60 animais, sendo 30 machos e 30 fêmeas, foram sacrificados por deslocamento cervical e seus cérebros foram rapidamente e cuidadosamente removidos. Em seguida, foram imersos em solução tampão fosfato-salino (PBS – do inglês Phosphate Buffered Saline) gelada. O PBS gelado tem o objetivo de baixar a temperatura do cérebro e torná-lo mais firme para facilitar a dissecção. Depois que o PBS foi removido utilizando-se toalha de papel, seis estruturas cerebrais foram dissecadas: córtex temporal, córtex frontal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra. Devido ao tamanho reduzido da substância negra, foi necessária a obtenção de um “pool” dos 10 animais por grupo.

As Figuras 3.2 e 3.3 ilustram as regiões cerebrais de ratos e humanos fazendo uma comparação entre elas. É possível observar nas figuras que os cérebros de ratos não possuem os sulcos e giros que o cérebro do humano apresenta.

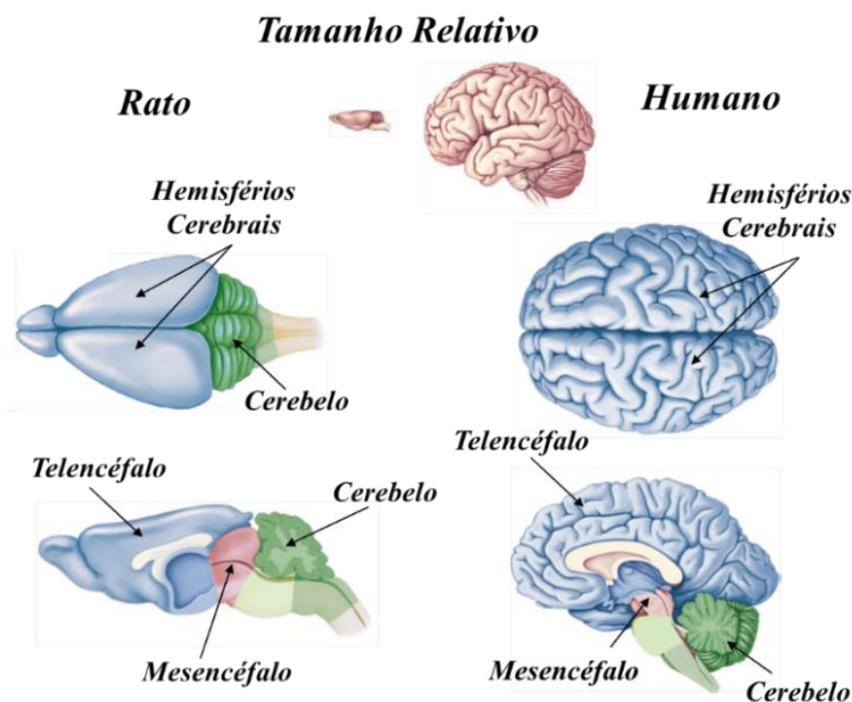


Figura 3.2 – Comparação entre o encéfalo humano e o encéfalo do rato (BEAR, 2017).

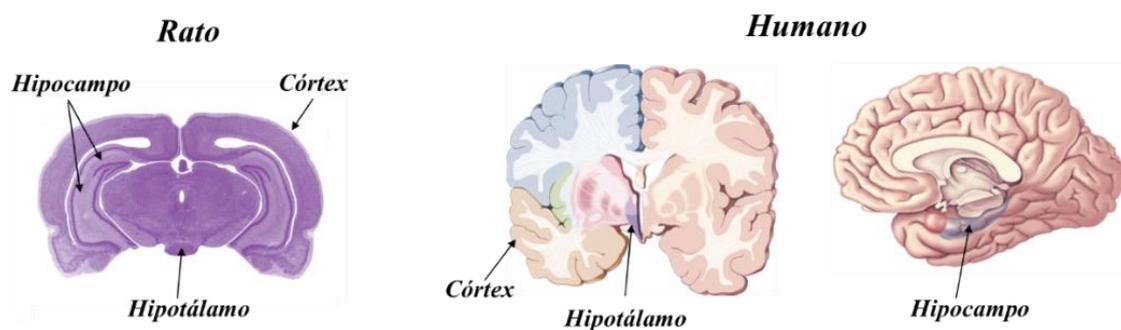


Figura 3.3 – Regiões do encéfalo humano e do encéfalo do rato (BEAR, 2017).

Após a dissecação das regiões cerebrais, a massa das amostras foi medida (≈ 5 mg) e em seguida mantidas em freezer -20 ou -80 °C até o momento da digestão ácida. Para isto, foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de ácido nítrico (HNO_3) a 65% e, em seguida, armazenadas em estufa a 80 °C durante 3 horas. Depois disto, foram adicionados $40 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a digestão prosseguiu por mais 2 horas a 80 °C. Ao final da digestão, as amostras foram diluídas com $1 \mu\text{L}$ de água ultrapura (Milli-Q). Após a diluição, foram adicionados $40 \mu\text{L}$ de solução de Gálio que é utilizado como um padrão interno. A solução foi homogeneizada em vórtex e uma alíquota de $8 \mu\text{L}$ foi colocada em um refletor retangular de Lucite (Perplex) pré limpo com as seguintes dimensões:

30 x 15 x 2 mm. Em seguida, os refletores com as amostras foram colocados para secar de forma lenta em uma estufa a 60 °C, conforme ilustra a Figura 3.4. Todas as amostras foram feitas em triplicada. A metodologia foi validada através da utilização de uma amostra padrão de material de referência (NIST- 1577b – fígado bovino) que foi preparada sob as mesmas condições das amostras de cérebro.

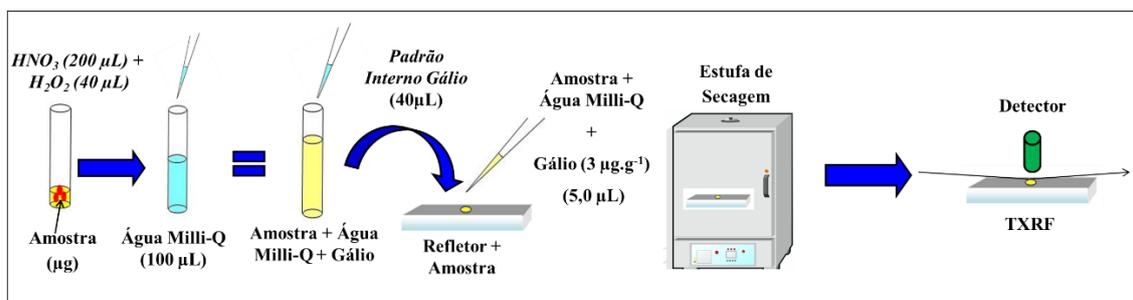


Figura 3.4 - Preparação de amostra para medidas de TXRF.

Para preparação do branco foram seguidos os mesmos passos da preparação das amostras das regiões cerebrais. Em um tubo foram depositados 15 μL de água Milli-Q. Em seguida foram adicionados 200 μL de ácido nítrico (HNO_3) a 65%, feita a digestão a 80 °C, passadas 3 horas foram adicionados 40 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a digestão prosseguiu por mais 2 horas a 80 °C. Ao final da digestão, foram adicionados 100 μL de água Milli-Q e 40 μL de Gálio homogeneizados, e transferidos 8 μL para um refletor que foi levado a secagem como ilustra a Figura 3.4.

III. 1.3.2 Preparação de Amostras para a Técnica de μTXRF

Sete dias após a injeção icv, 30 animais machos foram sacrificados por deslocamento cervical, seus cérebros removidos e dissecados. Em seguida, todos os cérebros foram imersos em água Milli-Q gelada para baixar a temperatura do tecido e desta forma, tornar mais fácil a obtenção das fatias. Após o choque térmico e secagem, os cérebros foram imersos em isopentano gelado para evitar que o tecido rachasse durante a obtenção dos cortes. Em seguida, utilizando um fatiador, Figuras 3.5 e 3.6, projetado no Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Técnicas Analíticas (LIETA) o cérebro foi fatiado (corte coronal) na região hipocampal com aproximadamente 1 mm de espessura, Figura 3.7. Para a realização dos cortes e obtenção das fatias, o fatiador precisou ser

resfriado com gelo seco. As amostras fatiadas foram armazenadas em cassetes com Ultralene® (4 µm) e colocadas para secar durante 48 horas em um dessecador elétrico.

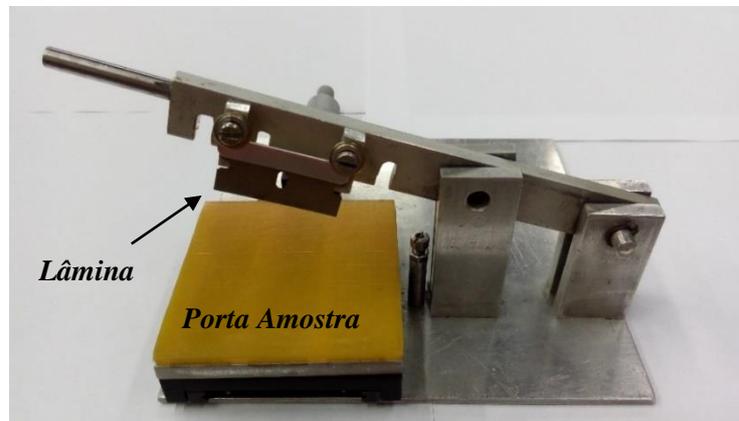


Figura 3.5 – Fatiador desenvolvido no Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Técnicas Analíticas (LIETA).

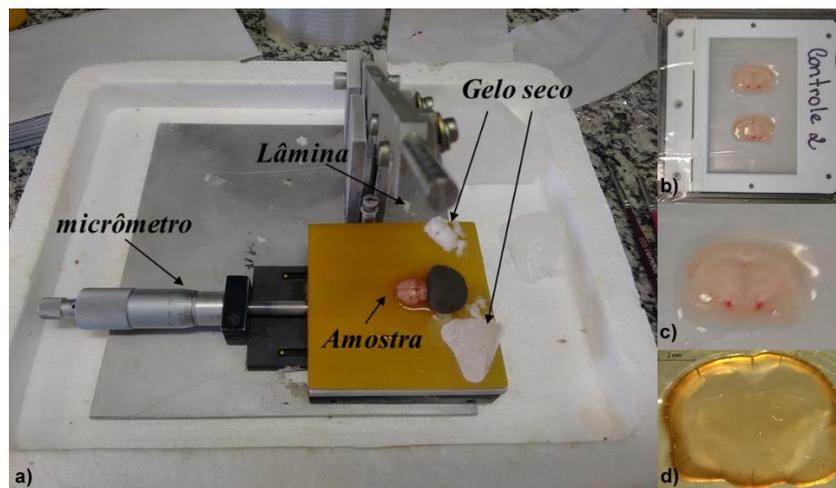


Figura 3.6 - Fotos mostrando o preparo das fatias: a) Fatiador com o cérebro inteiro e gelo seco nas laterais do fatiador para resfriá-lo e manter o cérebro firme durante a obtenção das fatias; b) Fatias dos cérebros armazenadas nos cassetes com Ultralene®; c) Fatia individual armazenada no Ultralene®; d) Amostras liofilizadas prontas para serem analisadas.

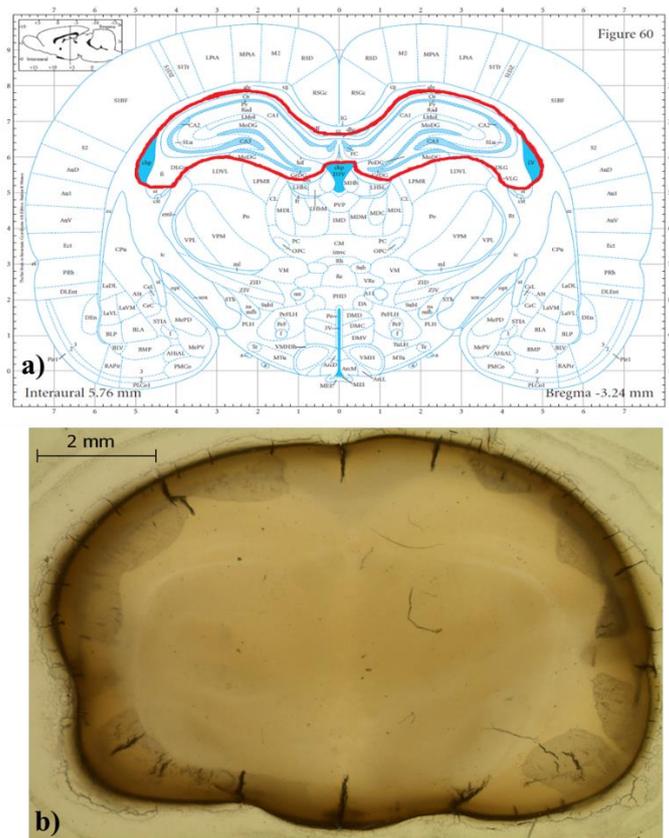


Figura 3.7 – Representação esquemática de: a) Secção coronal de cérebro de camundongo mostrando a região hipocampal circulado em vermelho (PAXINOS *et al.*, 2007 Adaptado); b) Foto de uma fatia em corte coronal liofilizada correspondente ao esquema.

III. 2. Arranjo Experimental.

III. 2.1 Arranjo Experimental para Técnica de TXRF

A medidas de TXRF foram realizadas utilizando-se um equipamento portátil de Reflexão Total de Raios X desenvolvido no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/UFRJ) no Rio de Janeiro. Para excitação foi utilizado um tubo de Raios X com anodo de molibdênio, da Oxford Instrumentes Inc. As amostras foram colocadas em um suporte posicionado a um ângulo de 1,0 mrad. Para obtenção do espectro, as amostras foram excitadas durante 600 s. Para a detecção, foi utilizado um detector modelo Si-PIN XR-100CR da Amptek e posicionado a 90° em relação ao feixe incidente, com o objetivo de reduzir o background espectral uma vez o número de Raios X espalhados no detector é minimizado nesta posição, Figura 3.8 (KLOCKENKAMPER *et al.*, 2015).

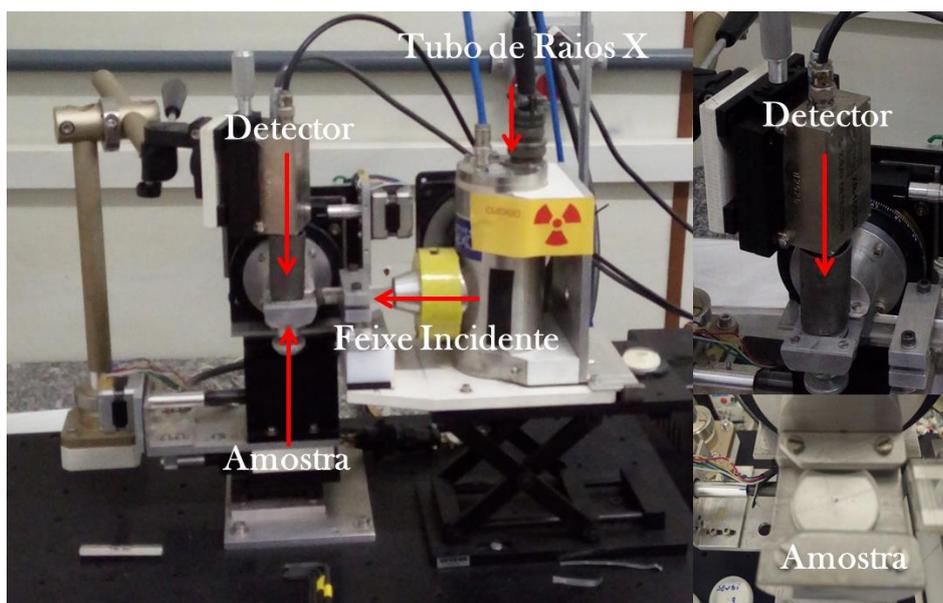


Figura 3.8 - Arranjo experimental para técnica de TXRF.

As Tabelas 3.1 e 3.2 mostram as principais características do tubo de Raios X e do detector utilizados na técnica de TXRF.

Tabela 3.1 – Características do tubo de raios X utilizado na técnica de TXRF.

Elementos	Características
Fabricante	Oxford Instruments Inc.
Modelo	TF.1000
Anodo	Molibdênio (Mo)
Tensão Máxima	50 kV
Corrente Máxima	1,7 A
Potência	50 W
Janela	Berílio (Be)
Espessura da janela de Be	127 μm
Tamanho focal (nominal)	55 μm

Tabela 3.2 – Características do detector de raios X utilizado na técnica de TXRF.

Elementos	Características
Fabricante	Amptek.
Modelo	XR-100CR
Série	N2026
Área ativa	6 mm ²
Espessura da janela de Be	25 μm
Espessura do cristal de Si	500 μm
FWHM em 5,9 keV	20 μs 145 – 165 eV
	15 μs 165 – 185 eV
	6 μs 185 – 210 eV

A Tabela 3.3 mostra as condições experimentais utilizadas na técnica de TXRF.

Tabela 3.3 – Condições experimentais do arranjo para obtenção dos espectros utilizando a técnica de TXRF

Condições experimentais	
Tensão	40 kV
Corrente	500 μA
Tempo de aquisição	600 s
Colimação do feixe de Raios X	10 x 0,48 mm

Os espectros de raios X característicos obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de Raios X (AXIL), distribuído pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), obtendo as intensidades dos raios X para cada elemento, associado a uma incerteza.

III. 2.2 Arranjo Experimental para Técnica de μSRXRF

III.2.2.1 - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas/SP, opera como única fonte de luz síncrotron da América Latina. Foi projetado e construído com tecnologia brasileira com financiamento do CNPq e do Ministério da Ciência e Tecnologia, e inaugurado em 1997, com instalações abertas para a comunidade científica e empresarial em todo o país e exterior. O LNLS tem como objetivo fomentar o

desenvolvimento científico e tecnológico, colocando ao alcance de pesquisadores do Brasil e do exterior, infraestrutura de luz síncroton, microscópicos eletrônicos de alta resolução, microscópios de varredura de ponta e espectrômetros de ressonância magnética nuclear.

No LNLS existem quinze estações experimentais de luz que oferecem ótimas condições para os cientistas realizarem pesquisas com nível de competitividade mundial, Figura 3.9. Atualmente, faz parte do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), junto com outros três: Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) e de Nanotecnologia (LNNano). CNPEM é uma instituição privada de pesquisa e desenvolvimento, fundada pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação.



Figura 3.9 – Panorâmica do anel no Laboratório Nacional de Luz Síncroton.

III.2.2.2 - Arranjo Experimental

As medidas de μ SRXRF foram realizadas na linha de Fluorescência de Raios X (D09-XRF) do LNLS. As amostras foram posicionadas em um suporte situado a 45° em relação ao detector e ao feixe incidente, ou seja, posicionamento $45^\circ/45^\circ$. O plano de imagem das amostras possui acurácia de $0,5 \mu\text{m}$ com três eixos (X, Y, Z) controlados através de um motor de passo.

As amostras foram excitadas utilizando um feixe branco com $20 \mu\text{m}$ de extensão na vertical e $29 \mu\text{m}$ na horizontal logrado por um sistema de micro-foco KB. O tamanho do passo foi de $20 \mu\text{m}$ em ambas as direções e o tempo de aquisição foi de 10 s/pixel . Para a detecção dos raios X característicos emitidos por cada pixel foi utilizado um detector Silicon Drift com resolução em energia de 165 eV em $5,9 \text{ keV}$ posicionado a 90°

em relação ao feixe incidente. O mapa bidimensional foi obtido depois da normalização da intensidade das linhas dos raios X característicos da câmara de ionização (detector A), razão $K\alpha/K\beta$, para as linhas referentes ao Zn estavam de acordo com o valor teórico determinado para amostras finas. Desta maneira, não foram necessárias correções devido a absorção pois as amostras podem ser consideradas filmes finos (BECKHOFF *et al.*, 2005).

A Tabela 3.4 mostra as condições experimentais e a Figura 3.10, o arranjo experimental.

Tabela 3.4 Condições experimentais para técnica de μ XRF

Condições Experimentais	
Feixe	Branco
Geometria	45°/45°
Câmara 1	2 x 1
Colimação do feixe de raios X	20 x 29 μ m
Absorvedor de alumínio	45 μ m
Detector de raios X	Silicon Drift com resolução de 165 eV em 5,9 keV
Distância amostra – detector	28,6 mm
Detector A	Câmara de ionização
Tempo de aquisição	10 s/pixel
Tamanho do Pixel	20 μ m x 29 μ m

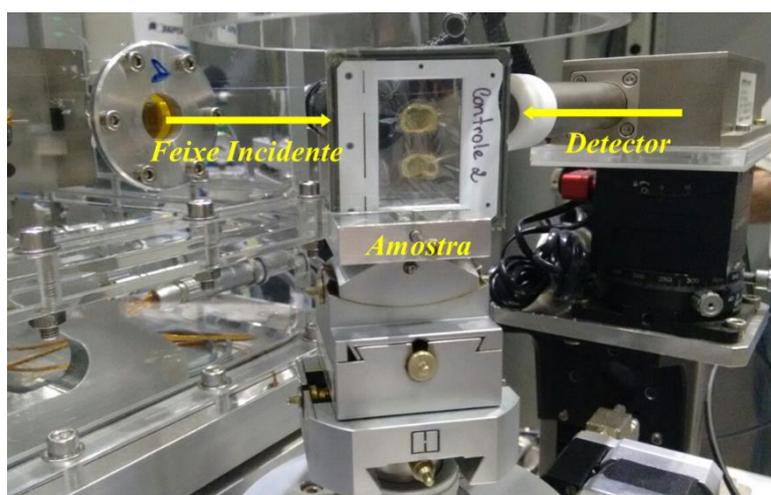


Figura 3.10 - Arranjo experimental μ SRXRF.

III. 2.3 Análise Estatística da μ SRXRF

Para a análise da distribuição elementar por μ SRXRF foram utilizados 10 animais machos de cada grupo: DA10, DA100 e controle. As imagens foram obtidas utilizando-se o software Pymca® (SOLÉ, *et al.*, 2007), desenvolvido por Software Group of the European Synchrotron Radiation Facility. Os valores utilizados foram obtidos considerando toda a superfície da fatia feita a partir do corte coronal do cérebro de camundongo e não separados por regiões cerebrais como realizada na técnica de TXRF. Os dados obtidos a partir do Pymca® foram analisados utilizando-se o software Action Stat. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para verificar a diferença estatística entre as medianas dos grupos estudados. Kruskal-Wallis é um teste não paramétrico com nível de significância de 5%.

CAPITULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV 1. Análise Quantitativa por TXRF

IV. 1.1 Calibração e Sensibilidade do Sistema de TXRF

Para a calibração do sistema foram utilizadas soluções multielementares com concentrações bem definidas. A calibração do sistema é usada para determinar a curva de sensibilidade do sistema.

A Tabela 4.1 apresenta as concentrações de cada elemento i presente nas soluções utilizadas para a obtenção da curva de sensibilidade relativa do sistema. As amostras de referência preparadas foram nomeadas como Sensi 1, Sensi 2 e Sensi 3, apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Concentrações das soluções multielementares utilizadas para o cálculo das sensibilidades relativa do sistema TXRF.

Sensi 1		Sensi 2		Sensi 3	
Elemento i	W_i ($\mu\text{g/g}$)	Elemento i	W_i ($\mu\text{g/g}$)	Elemento i	W_i ($\mu\text{g/g}$)
P	700	K	100	S	150
Sc	50	Ti	70	Ca	50
Cr	15	Fe	12,5	V	25
Ni	10,5	Zn	10	Cu	7,5
Ga	5,0	Ga	2,5	Ga	2,5
Ge	7,5	Sr	30	Rb	15

O gráfico de sensibilidade é construído considerando-se as diferentes concentrações de um elemento i , representando a relação linear entre a intensidade da radiação fluorescente e a concentração elementar, logo, ao se obter as várias concentrações para um dado elemento i (elemento cuja concentração pretende-se definir na amostra) pode-se determinar a sensibilidade relativa para o mesmo elemento. Ao se estender este processo para outros elementos, tem-se a sensibilidade relativa que pode ser representada graficamente numa relação entre o número atômico (Z) do elemento e sua respectiva sensibilidade, Figura 4.1.

A Figura 4.1 representa o gráfico da sensibilidade relativa em função do número atômico (Z) para a linha K obtida experimentalmente através da técnica de TXRF.

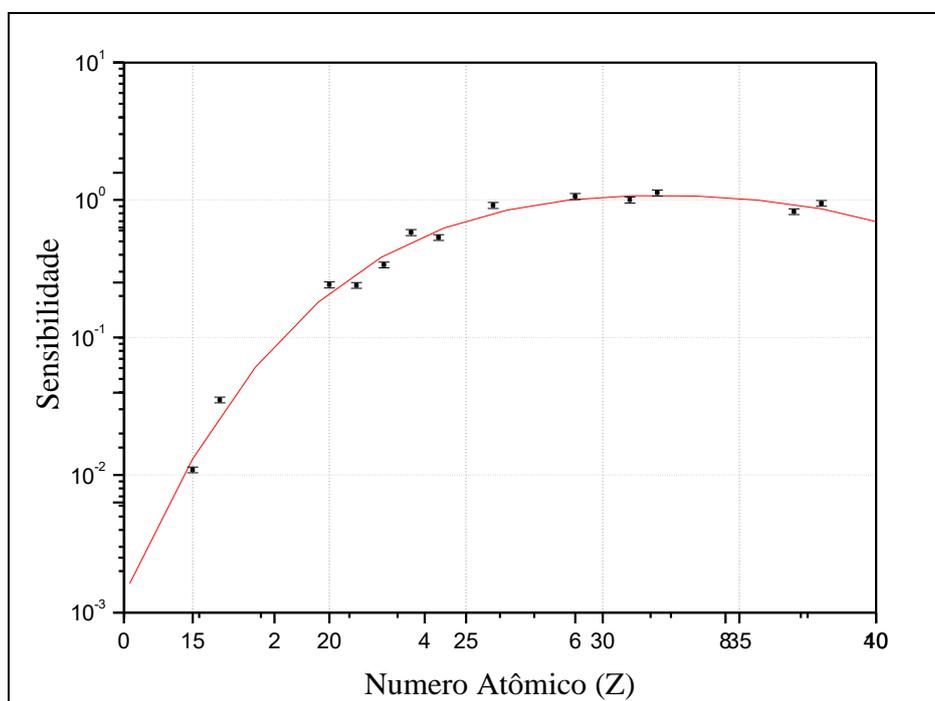


Figura 4.1 – Curva de sensibilidade relativa (S_{ri}) para a linha K –TXRF.

A curva de sensibilidade para a linha K foi ajustada para um polinômio de ordem quatro com coeficiente de correlação 0,989. A curva de sensibilidade ajustada do sistema para as linhas K no arranjo experimental é dada pela equação 4.1.

$$S_{ri} = \log(-15,07 + 1,65 * Z - 0,07 * Z^2 + 1,33 * 10^{-3} * Z^3 - 1,00 * 10^{-5} * Z^4) \quad (4.1)$$

IV. 1.2 Limite de Detecção

A acurácia, precisão e validação experimental foram feitas através da análise de um material de referência, NIST – Standard Reference Material 1577b (Fígado Bovino).

A curva para os limites de detecção obtida para as amostras certificadas de fígado bovino é apresentada na Figura 4.2. A curva foi ajustada para um polinômio de ordem três com coeficiente de correlação 0,960.

$$LD = \log(21,62 + 2 * Z - 0,06 * Z^2 + 5,19 * 10^{-4} * Z^3) \quad (4.2)$$

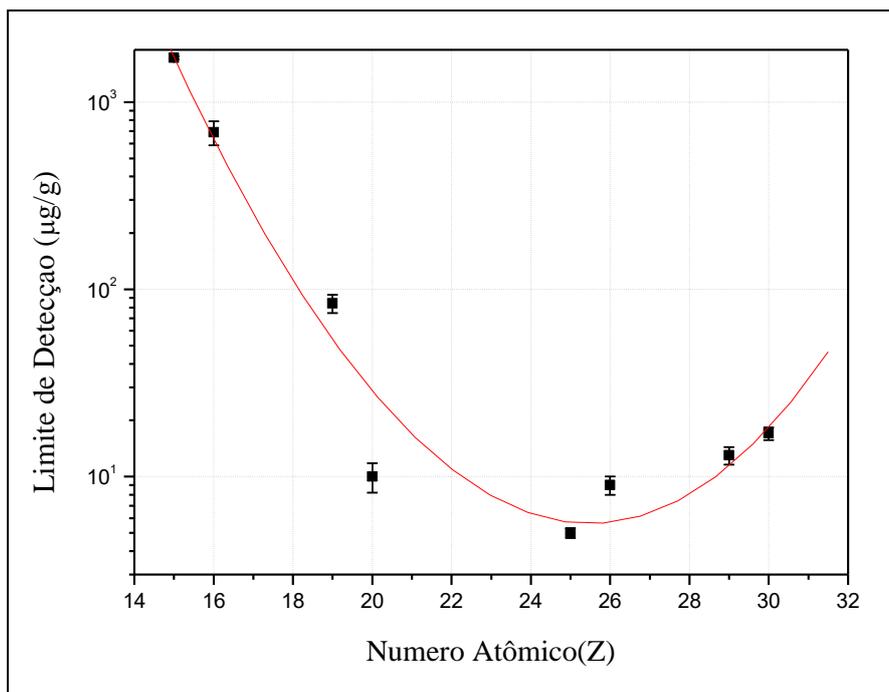


Figura 4.2 – Curva obtida para o limite de detecção da linha K para as amostras certificadas: NIST – Standard Reference Material 1577b (Fígado Bovino)

A Tabela 4.2 apresenta a média das concentrações medidas por TXRF, os valores certificados, o desvio relativo e o erro relativo. O erro relativo varia de 0,6% (Cu) até 8,7% (K), que significa que os resultados obtidos estão de acordo com os valores certificados.

Tabela 4.2 – Comparação entre os resultados experimentais e os valores de referência do material de referência: NIST - Standard Reference Material 1577b (Fígado Bovino).

Elemento	TXRF ^{a)} (µg.g ⁻¹)	Valor Certificado (µg.g ⁻¹) ^{b)}	Erro Relativo (%)
P	10129 ± 590	11000 ± 300	7,9
S	7793 ± 574	7850 ± 60	0,7
K	9071 ± 690	9940 ± 20	8,7
Ca	107 ± 35	116 ± 4	7,5
Fe	174 ± 20	184 ± 15	5,4
Cu	159 ± 9	160 ± 8	0,6
Zn	125 ± 7	127 ± 16	0,9

a) Média ± desvio-padrão relativo.

b) Média ± erro sistemático

IV. 1.3 Análise Estatística

Os espectros foram analisados pelo software AXIL do pacote Quantitative X-ray Analysis package da Agência Internacional de Energia Atômica. As concentrações foram calculadas levando em consideração o padrão interno Ga e os brancos experimentais. A fim de investigar a presença de valores extremos, foi utilizado o teste estatístico de Grubb's e, após a aplicação do teste, os outliers foram excluídos. Para identificar as diferenças nas concentrações elementares entre os grupos tratados com A β Os e grupos controle foi utilizado o teste estatístico de Dunnett, com um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). Os testes estatísticos, Grubb's e Dunnett, foram realizados utilizando-se o software estatístico GraphPad Prism 6.

IV. 1.4 Resultados da Análise por TXRF

Foram apresentados no Capítulo 2 os fundamentos da análise quantitativa da TXRF. As concentrações elementares são obtidas segundo a equação 2.43, a partir da medida das intensidades dos raios X fluorescentes emitidas pelo elemento i em função da sensibilidade do sistema. As intensidades em função da energia foram obtidas através do programa AXIL. Na Figura. 4.3 é apresentado um espectro típico do córtex temporal de um camundongo suíço.

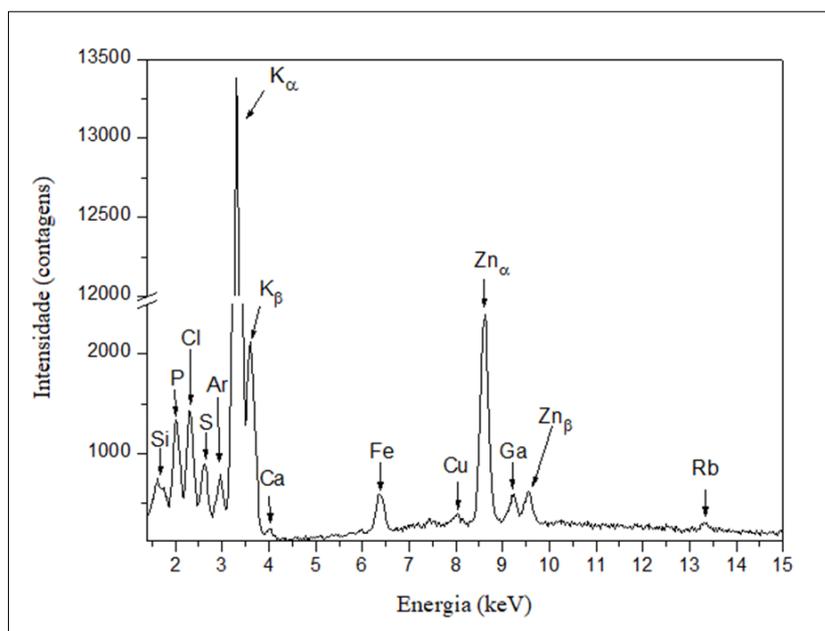


Figura. 4.3 – Espectro de fluorescência do córtex temporal de um camundongo suíço.

Através da técnica de TXRF foi possível determinar, nas regiões cerebrais estudadas, a presença dos elementos: fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, ferro, cobre, zinco e rubídio. Além destes, foi observada a presença do gálio, utilizado como padrão interno nas amostras. Foi observada também a presença de silício que é o material da qual o refletor é composto e onde as amostras são medidas. Entretanto, o argônio observado no espectro é devido à presença de ar atmosférico. Além disto, o cálcio encontrado nas amostras não foi considerado, pois sua concentração foi menor que o seu limite de detecção. O elemento cloro também não foi levado em consideração devido à perda que ocorre deste elemento ao se realizar a digestão ácida (ácido nítrico e peróxido de hidrogênio).

As figuras apresentadas a seguir mostram os resultados dos grupos experimentais controle, DA10 e DA100, machos e fêmeas. Os resultados obtidos para os grupos experimentais DA10 e DA100 foram comparados com os valores encontrados para o grupo controle e foram consideradas diferenças estatísticas significativas $p \leq 0,05$. A comparação foi feita apenas entre os animais do mesmo sexo, não havendo comparação dos resultados entre fêmeas e machos. Os valores obtidos pela técnica de TXRF para as concentrações elementares são apresentados no Anexo A.

As Figuras 4.4 – 4.9 apresentam os resultados obtidos para o elemento fósforo em cada uma das regiões analisadas: córtex frontal, córtex temporal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra.

Conforme mostrado na Figura 4.4, as concentrações de fósforo no córtex frontal das fêmeas apresentaram diferenças estatísticas quando comparados com o grupo controle em ambos os grupos estudados, DA10 e DA100, apresentando um aumento nos níveis de fósforo, enquanto que para o grupo dos machos foram observadas diferenças estatísticas apenas no grupo DA100, onde houve redução na concentração do fósforo.

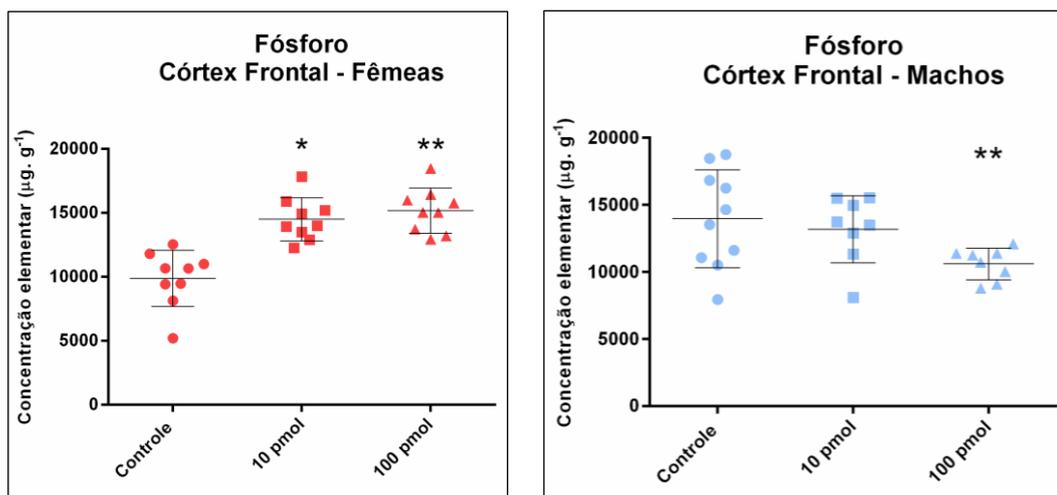


Figura 4.4 - Concentração de fósforo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Na Figura 4.5, onde são apresentados os valores encontrados para os níveis de fósforo no córtex temporal dos animais estudados, apenas o grupo DA100 das fêmeas mostrou diferença estatística quando comparado ao grupo controle, mostrando que houve um aumento na concentração de fósforo neste grupo.

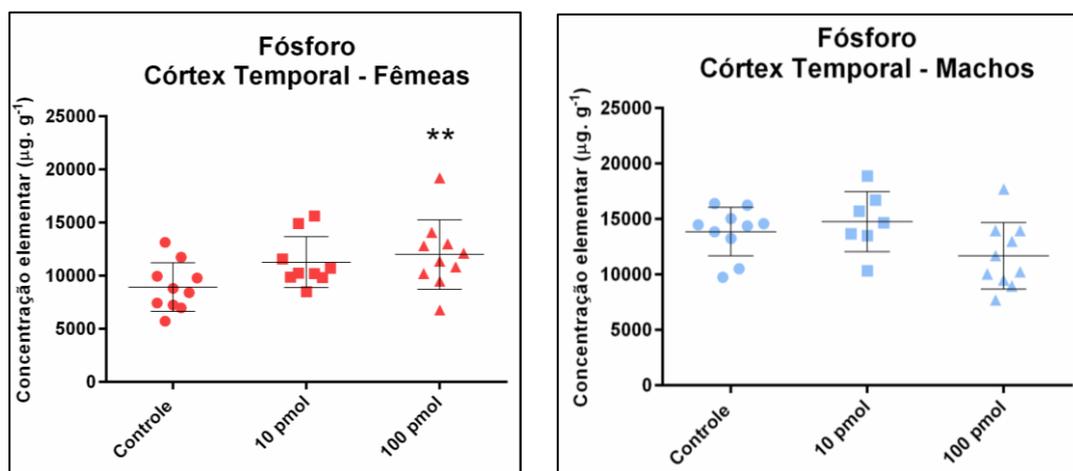


Figura 4.5 - Concentração de fósforo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Para o hipocampo, Figura 4.6, foram encontradas diferenças estatísticas nas concentrações de fósforo em todos os grupos estudados, DA10 e DA100. Quando comparado com o grupo controle, o grupo das fêmeas mostrou um aumento nos níveis de fósforo, enquanto que no grupo dos machos, quando comparado ao controle deste grupo, mostrou redução nos níveis de fósforo.

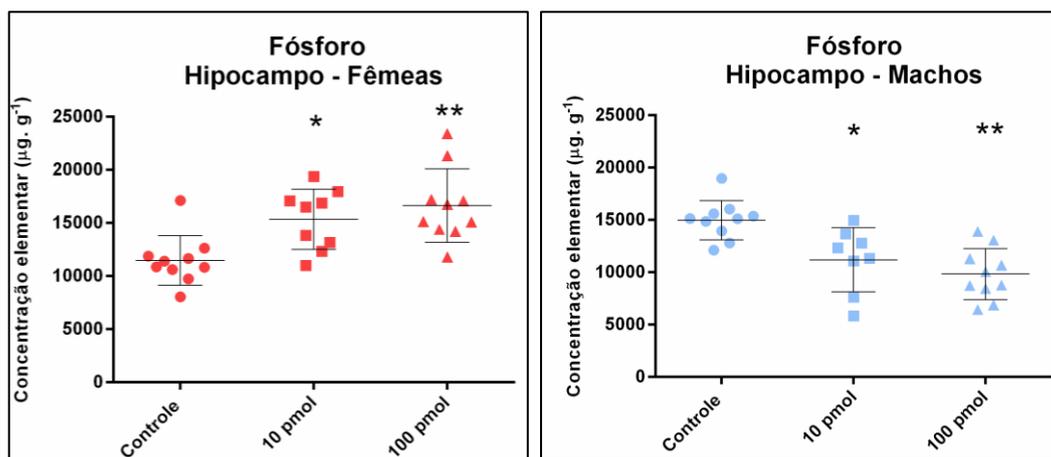


Figura 4.6 - Concentração de fósforo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Na Figura 4.7 são apresentados os valores para as concentrações do fósforo no hipotálamo dos grupos estudados. Nesta região, quando comparados aos seus respectivos grupos controle, foram observadas diferenças estatísticas nas fêmeas e machos apenas nos grupos DA100. As fêmeas apresentaram aumento nos níveis de fósforo, enquanto que os machos apresentaram redução.

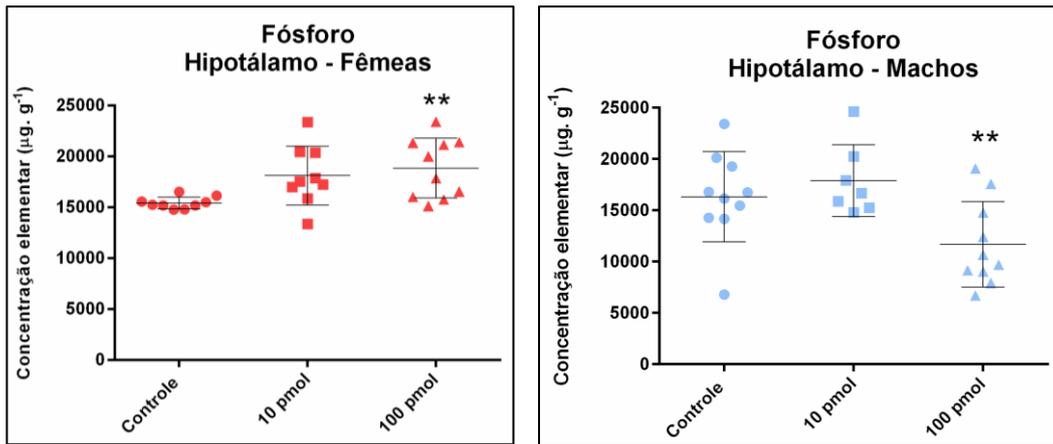


Figura 4.7 - Concentração de fósforo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Ao comparar o grupo controle com o grupo DA10 e DA100, a Figura 4.8 mostra que não houve diferença estatística nos níveis de fósforo no cerebelo em nenhum dos grupos estudados, tanto nas fêmeas quanto nos machos.

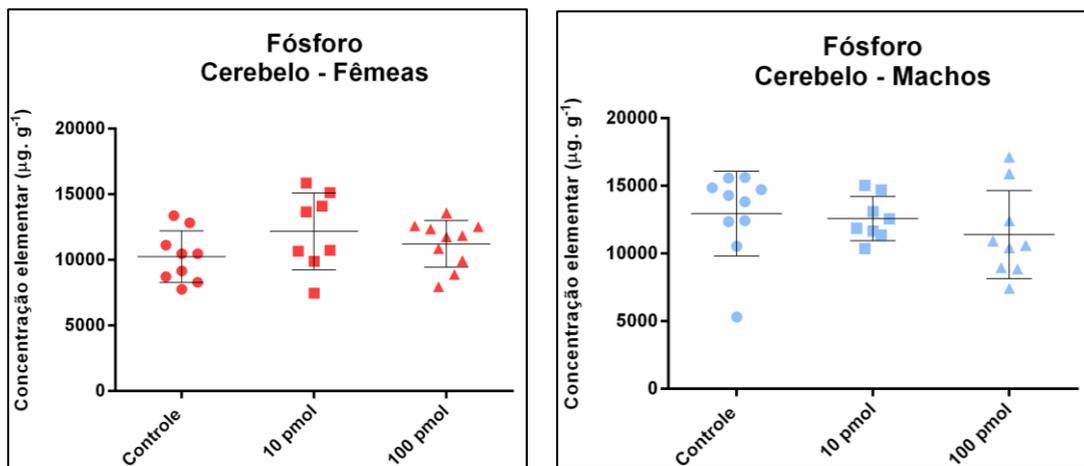


Figura 4.8 - Concentração de fósforo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos.

Os valores obtidos para substância negra, ao serem comparados ao grupo controle das fêmeas, mostrou aumento nos níveis de fósforo do grupo DA100, enquanto que, no grupo DA10 dos machos, houve redução na concentração de fósforo em relação ao grupo controle dos machos, como mostra a Figura 4.9

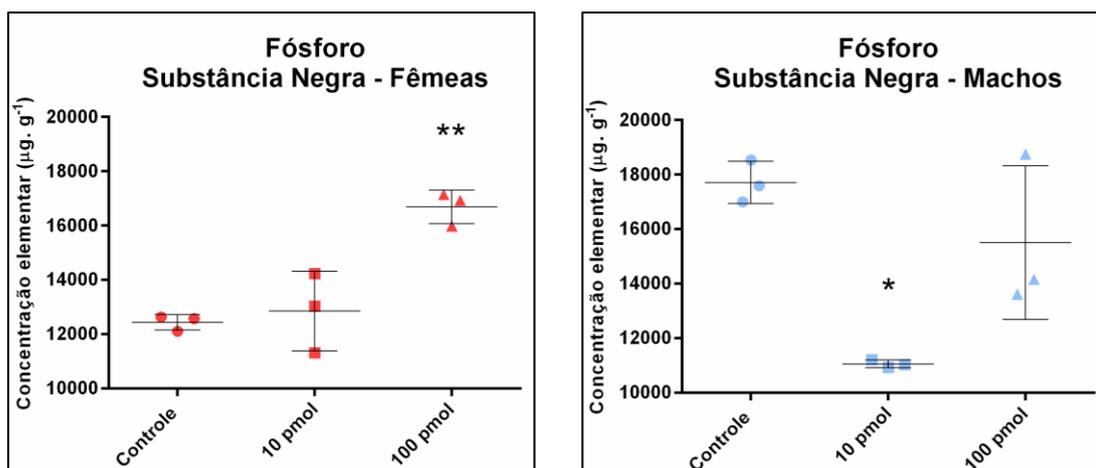


Figura 4.9 - Concentração de fósforo ($\mu\text{g. g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

As Figuras 4.10 – 4.15 apresentam os resultados obtidos para o elemento enxofre em cada uma das regiões analisadas: córtex frontal, córtex temporal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra.

Na Figura 4.10 são apresentados os resultados encontrados para o córtex frontal dos machos e fêmeas. Quando comparados com o grupo controle, foram observadas diferenças significativas apenas no grupo das fêmeas, onde é possível observar que houve um aumento nas concentrações do enxofre em ambos os grupos DA10 e DA100. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais dos machos.

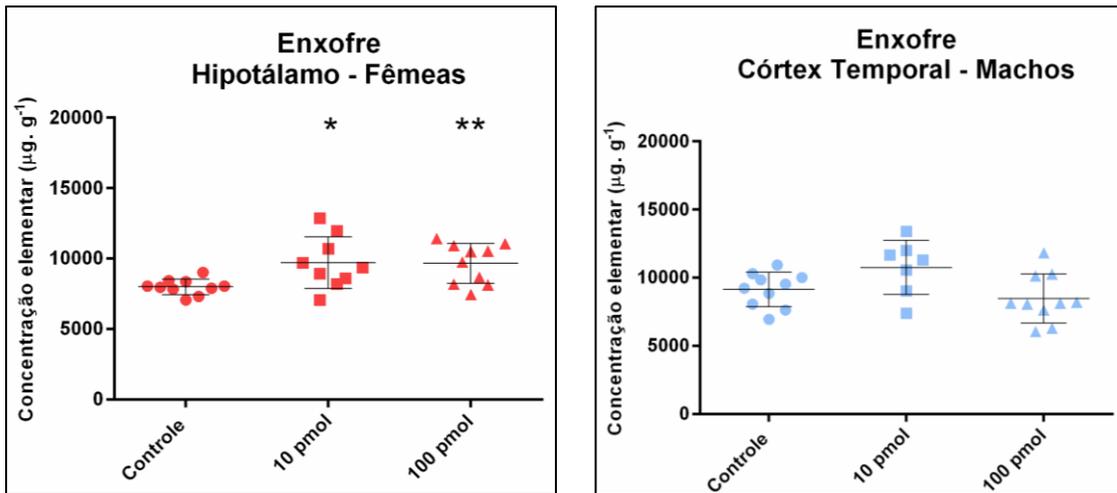


Figura 4.10 - Concentração de enxofre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Ao comparar os resultados do elemento enxofre no córtex temporal dos grupos DA10 e DA100 com o grupo controle, não houve diferença estatística em nenhum dos grupos estudados como mostrado na Figura 4.11.

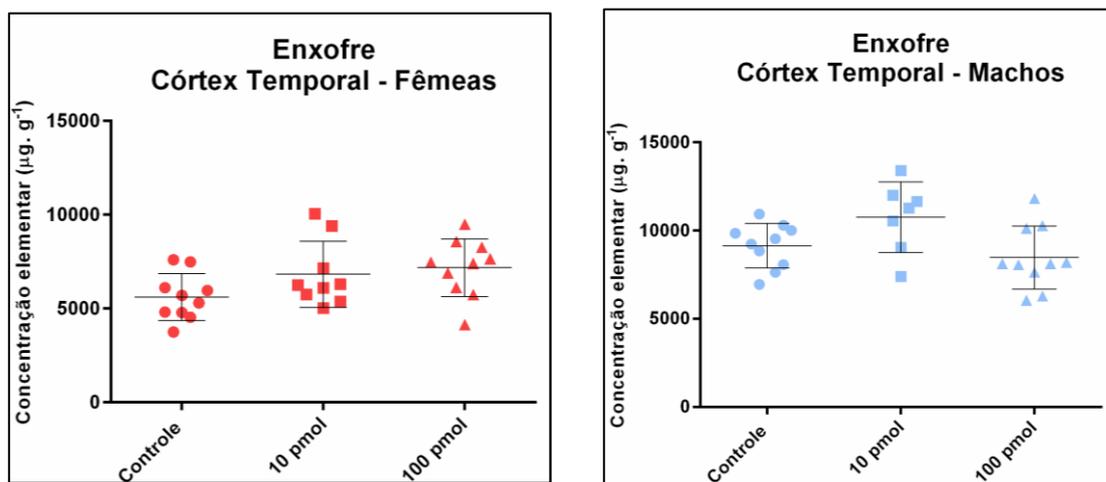


Figura 4.11 - Concentração de enxofre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos.

Para o hipocampo, quando comparados ao grupo controle, foram encontradas diferenças estatísticas nos níveis de enxofre dos grupos estudados, tanto nas fêmeas quanto nos machos, como mostra a Figura 4.12. Para as fêmeas foi observado aumento

na concentração de enxofre em ambos os grupos, DA10 e DA100. Por outro lado, os grupos dos machos apresentaram redução nos níveis de enxofre.

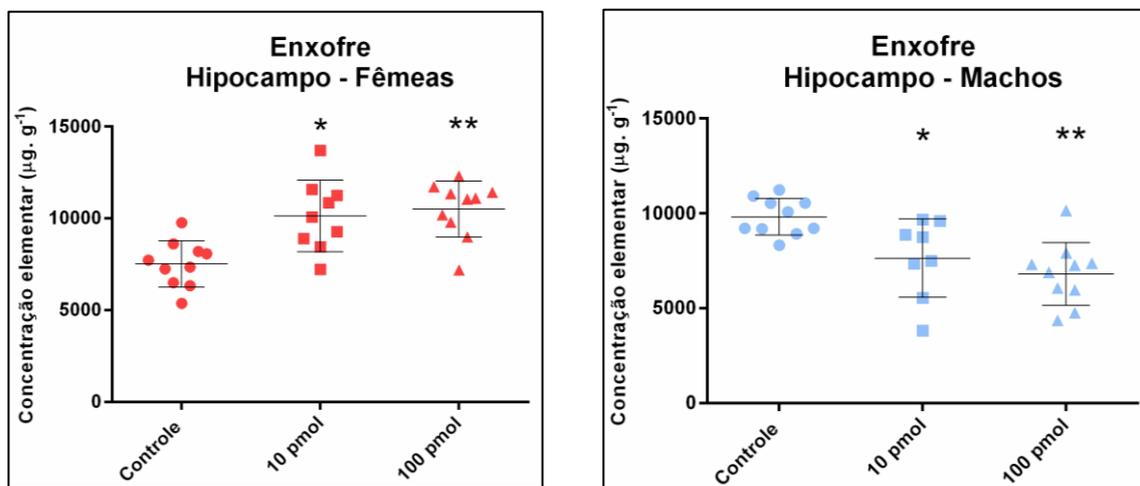


Figura 4.12 - Concentração de enxofre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Os resultados apresentados na Figura 4.13 mostram que, quando comparados com os valores obtidos para o grupo controle, as fêmeas mostram aumento nos níveis de enxofre em ambos os grupos enquanto que, nos grupos dos machos, não há diferença estatística em relação ao grupo controle.

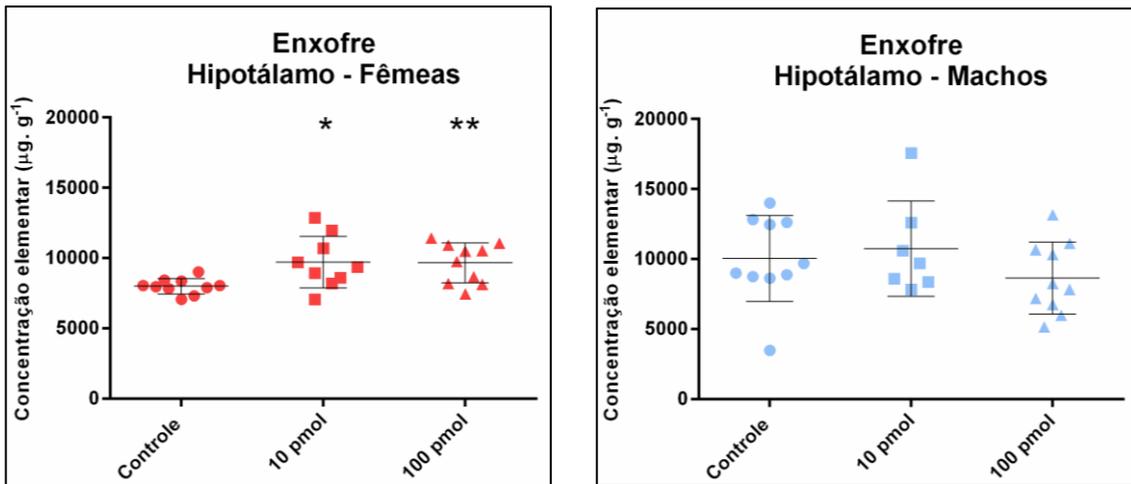


Figura 4.13 - Concentração de enxofre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Na Figura 4.14 são apresentados os resultados para os níveis de enxofre no cerebelo dos animais estudados. Todos os grupos, DA10 e DA100, foram comparados ao grupo controle de ambos os sexos e não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de enxofre em nenhum dos grupos.

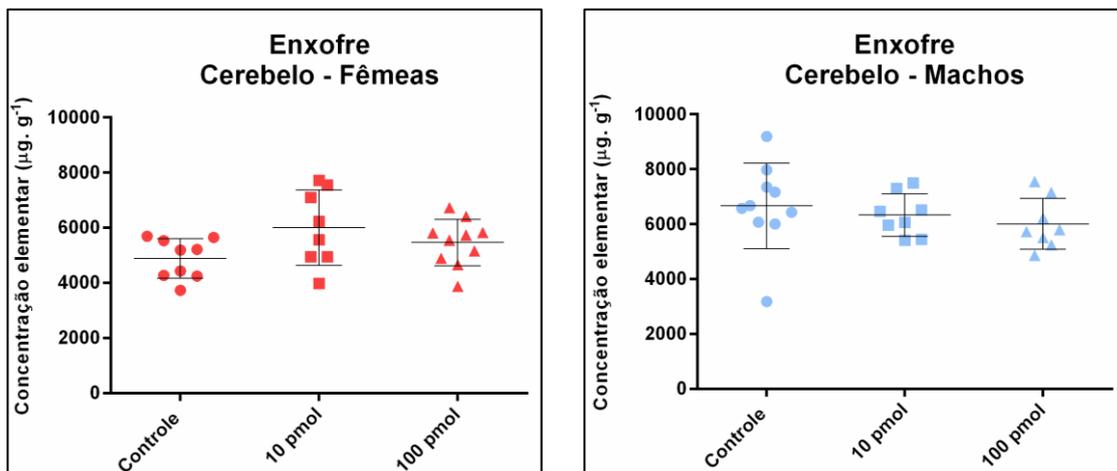


Figura 4.14 - Concentração de enxofre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos.

Para substância negra, quando os grupos DA10 e DA100 foram comparados aos seus respectivos grupos controle, fêmeas e machos, diferenças estatísticas foram observadas. Nas fêmeas do grupo DA100 houve aumento na concentração de enxofre.

Por outro lado, nos machos houve redução nos níveis de enxofre no grupo DA10 conforme é mostrado na Figura 4.15.

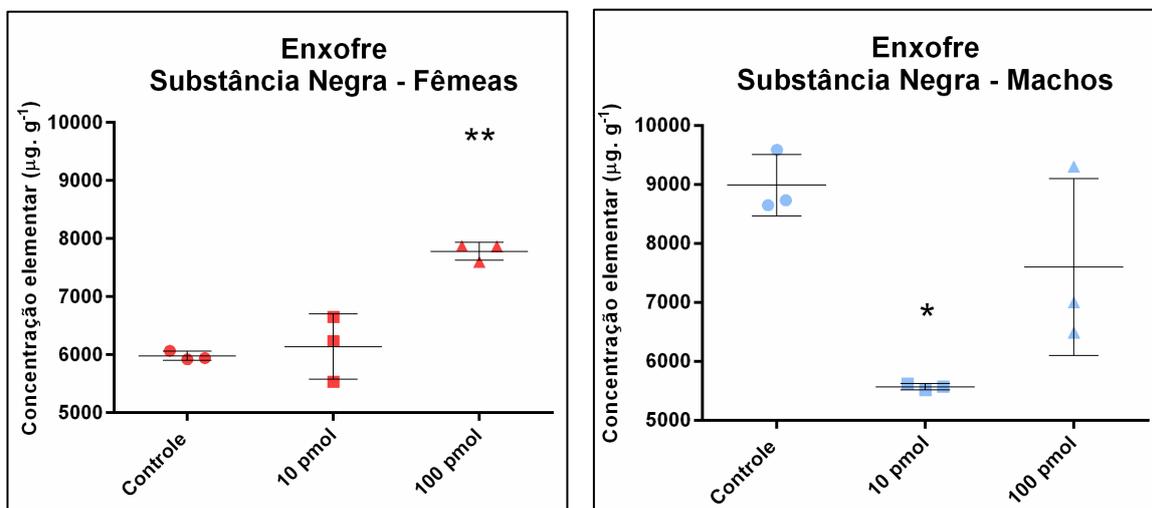


Figura 4.15 - Concentração de enxofre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

As Figuras 4.16 – 4.21 apresentam os resultados obtidos para o elemento potássio em cada uma das regiões analisadas: córtex frontal, córtex temporal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra.

Quando comparados ao grupo controle das fêmeas, o córtex frontal apresentou aumento de potássio em ambos os grupos estudados, DA10 e DA100, já os machos, quando comparados ao grupo controle, não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos estudados como mostra a Figura 4.16.

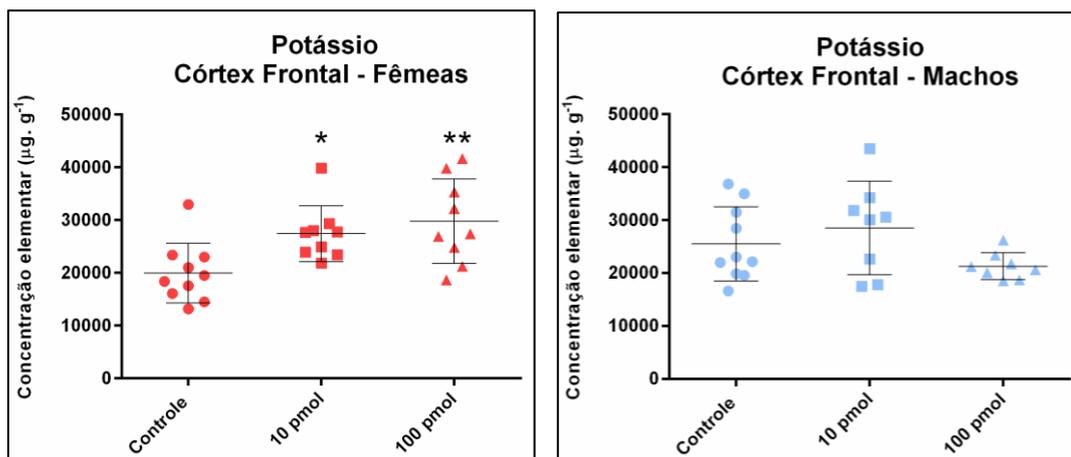


Figura 4.16 - Concentração de potássio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Para o córtex temporal, ao comparar os grupos DA10 e DA100 aos seus respectivos grupos controle, fêmeas e machos, foi observado que houve aumento na concentração de potássio tanto nos machos como nas fêmeas. Entretanto, estas diferenças foram observadas nas fêmeas no grupo DA100 e, nos machos, no grupo DA10, Figura 4.17.

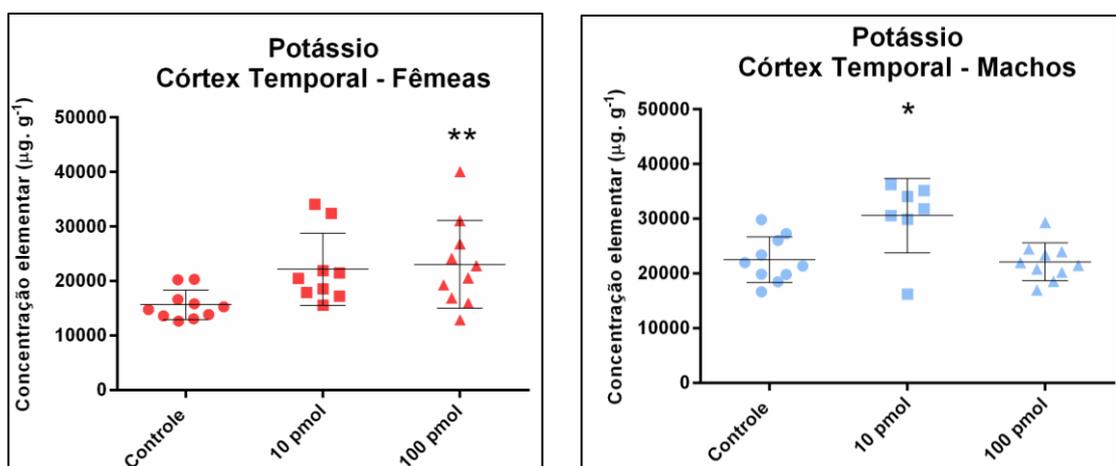


Figura 4.17 - Concentração de potássio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Na Figura 4.18 são apresentados os resultados para os níveis de potássio no hipocampo. O hipocampo apresentou diferenças estatísticas em todos os grupos estudados quando comparados com seus respectivos grupos controle. Nas fêmeas, foi observado aumento nestes níveis de potássio, enquanto que, nos machos, houve redução destes mesmos níveis.

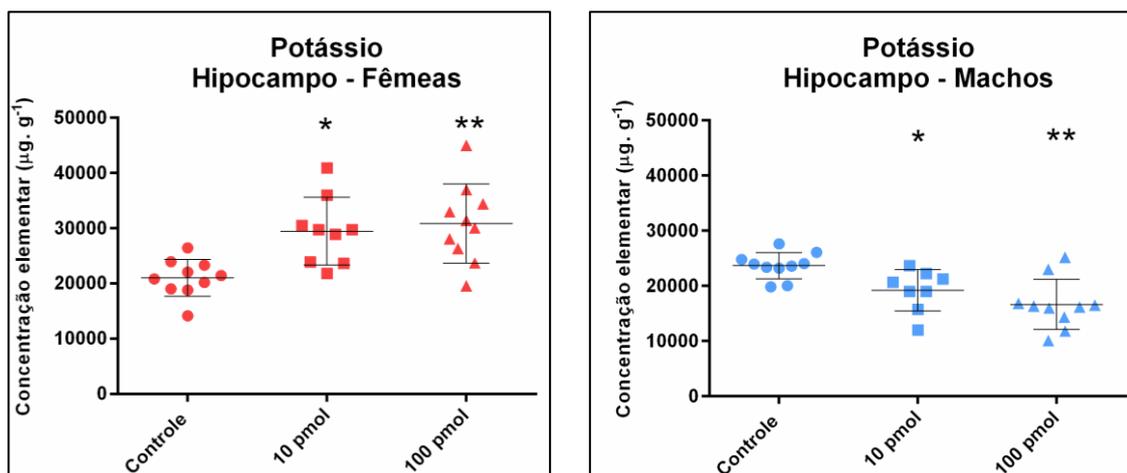


Figura 4.18 - Concentração de potássio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

O hipotálamo apresentou aumento da concentração de potássio em relação ao grupo controle apenas nas fêmeas, Figura 4.19.

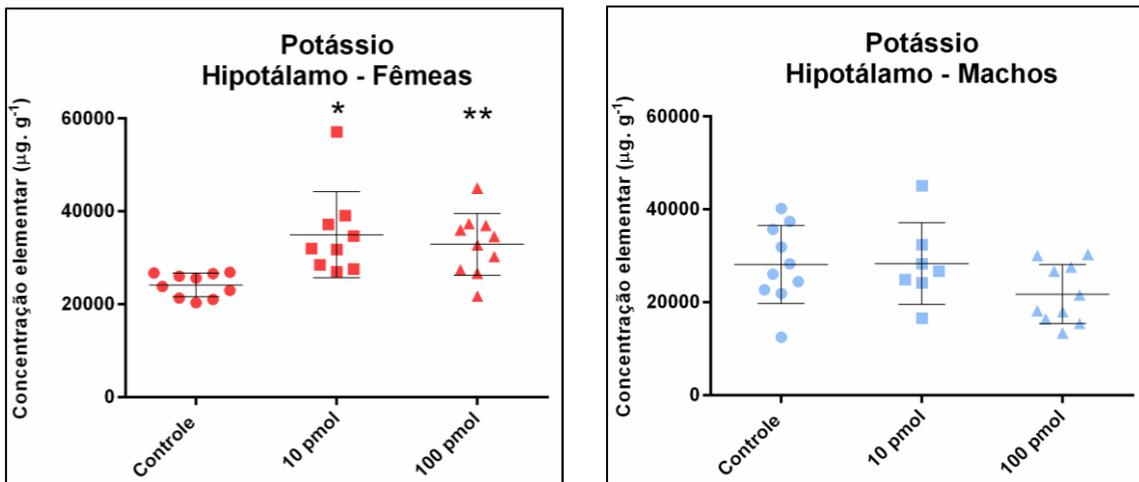


Figura 4.19 - Concentração de potássio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Na Figura 4.20 foram observadas diferenças nos níveis de potássio no cerebelo apenas nos machos, em ambos os grupos com a DA, onde houve redução nos níveis deste elemento quando comparados ao grupo controle.

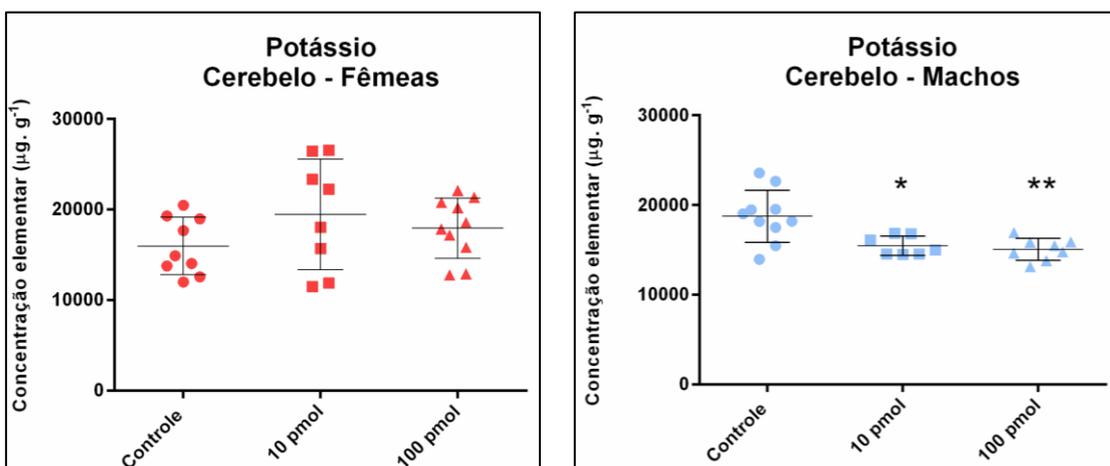


Figura 4.20 - Concentração de potássio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Na Figura 4.21, onde são apresentados os resultados para os níveis de potássio na substância negra, é possível ver que, quando comparado com o grupo controle de ambos

os sexos, houve diferenças estatísticas em todos os grupos. Entretanto, enquanto houve aumento nos níveis de potássio nas fêmeas, os machos apresentaram redução na concentração deste elemento.

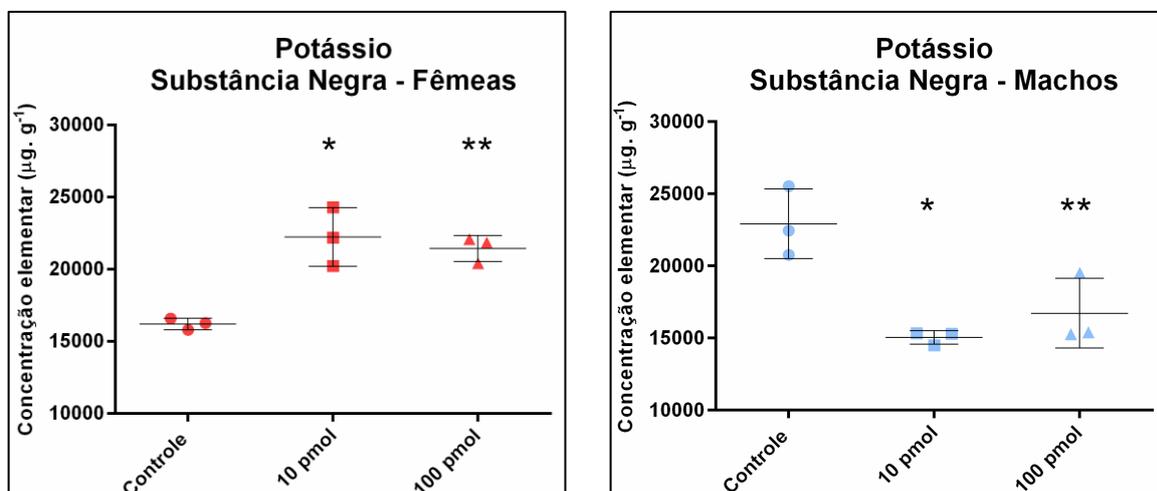


Figura 4.21 - Concentração de potássio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

As Figuras 4.22 – 4.28 apresentam os resultados obtidos para o elemento ferro em cada uma das regiões analisadas: córtex frontal, córtex temporal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra.

Os resultados obtidos para o ferro, no córtex frontal dos animais do grupo DA, quando comparados com o grupo controle das fêmeas e machos, não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos, Figura 4.22.

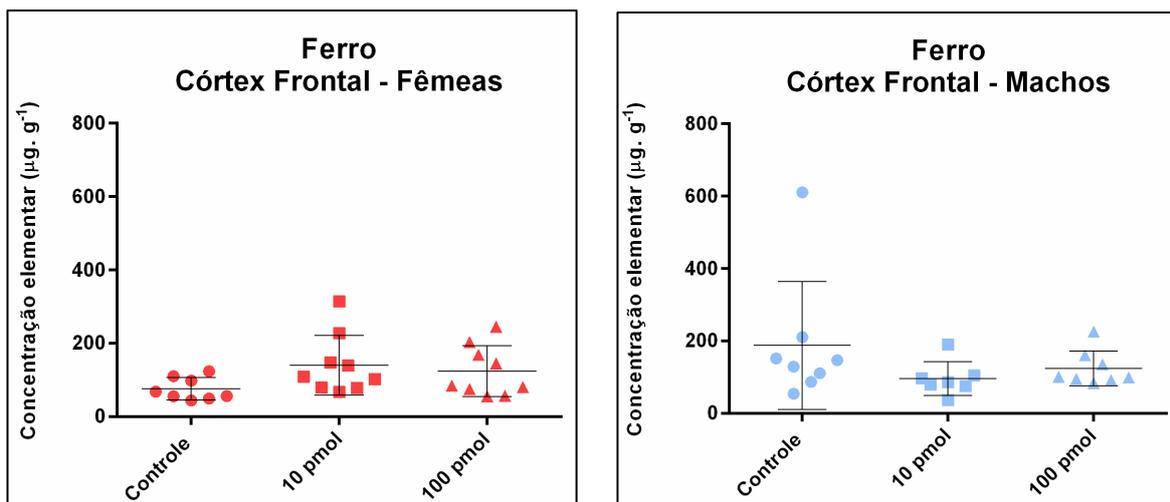


Figura 4.22 - Concentração de ferro ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos.

Conforme é mostrado na Figura 4.23, as concentrações de ferro obtidas para o córtex temporal dos animais estudados só mostraram diferença estatística quando comparados ao grupo controle nas fêmeas do grupo DA10, onde foi observado aumento deste elemento.

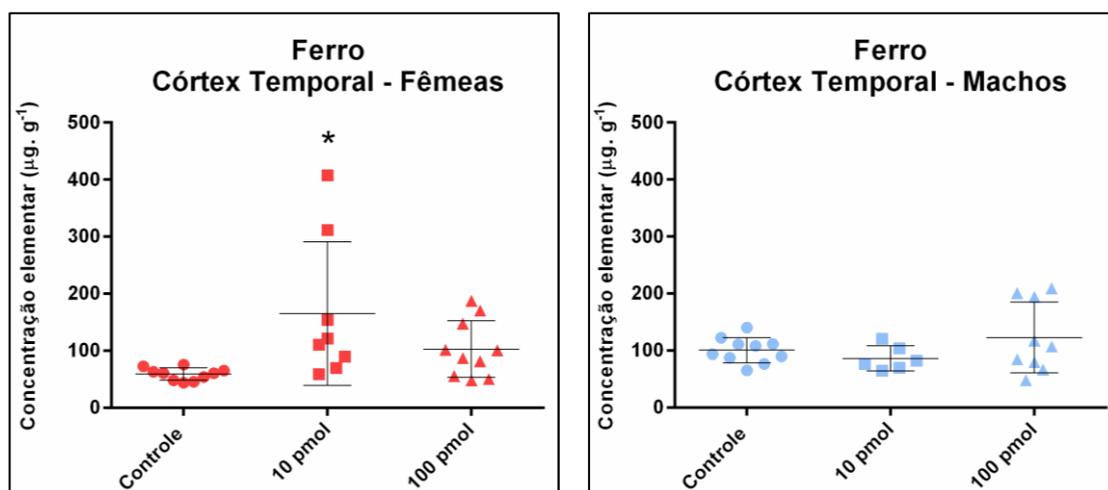


Figura 4.23 - Concentração de ferro ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

No hipocampo, a concentração de ferro quando comparada com o grupo controle, mostrou aumento apenas no grupo DA10 das fêmeas, Figura 4.24.

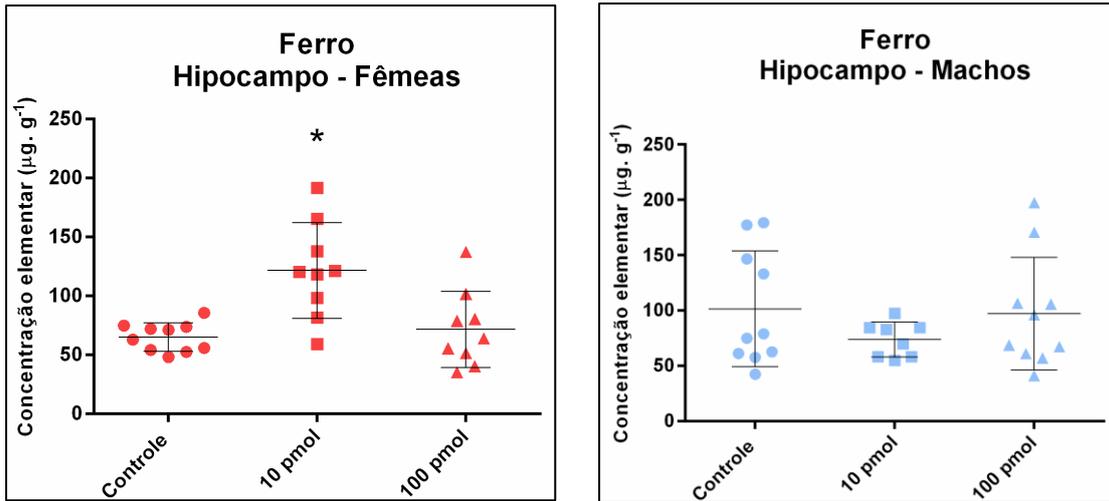


Figura 4.24 - Concentração de ferro ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

Os resultados da Figura 4.25 mostram os valores obtidos para o ferro no hipotálamo dos animais estudados. Houve aumento na concentração apenas no grupo DA10 fêmeas quando comparado ao grupo controle.

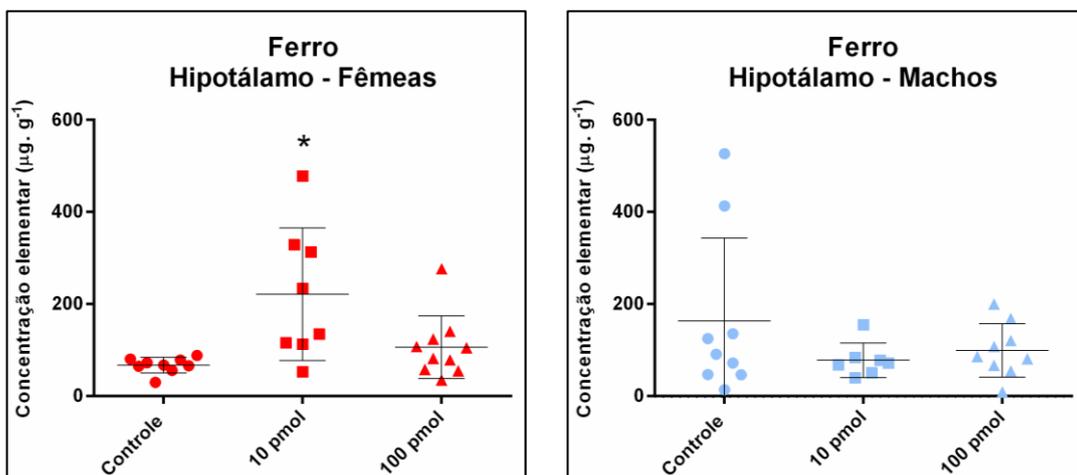


Figura 4.25 - Concentração de ferro ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

O cerebelo não mostrou diferença estatística para o ferro quando comparado ao controle das fêmeas e machos em nenhum dos grupos estudados, Figura 4.26.

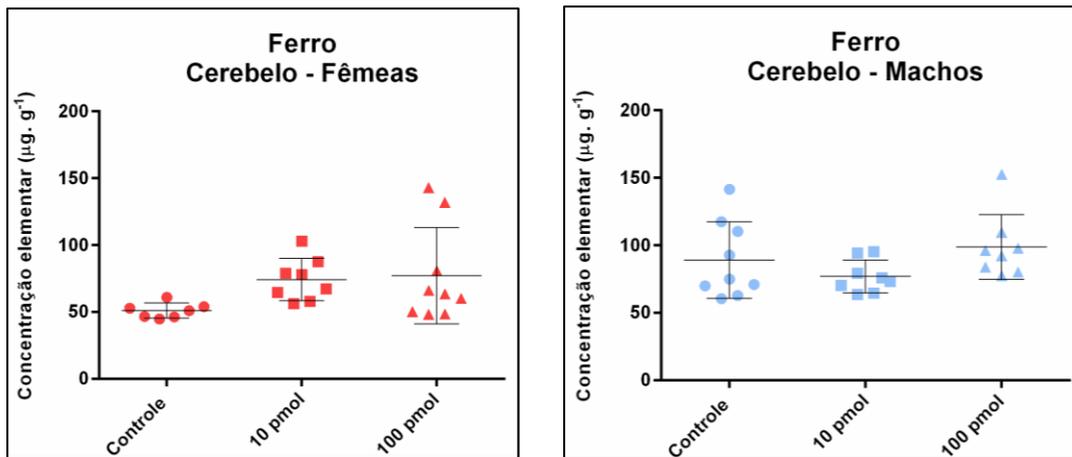


Figura 4.26 - Concentração de ferro ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos.

Na Figura 4.27, são apresentados os resultados dos níveis de ferro na substância negra. É possível ver que, quando comparado com o grupo controle, houve diferenças estatísticas nos grupos das fêmeas e dos machos. Entretanto, enquanto houve aumento nos níveis de ferro em ambos os grupos, DA10 e DA100, nas fêmeas, os machos, apresentaram redução na concentração deste elemento no grupo DA10 e aumento no grupo DA100.

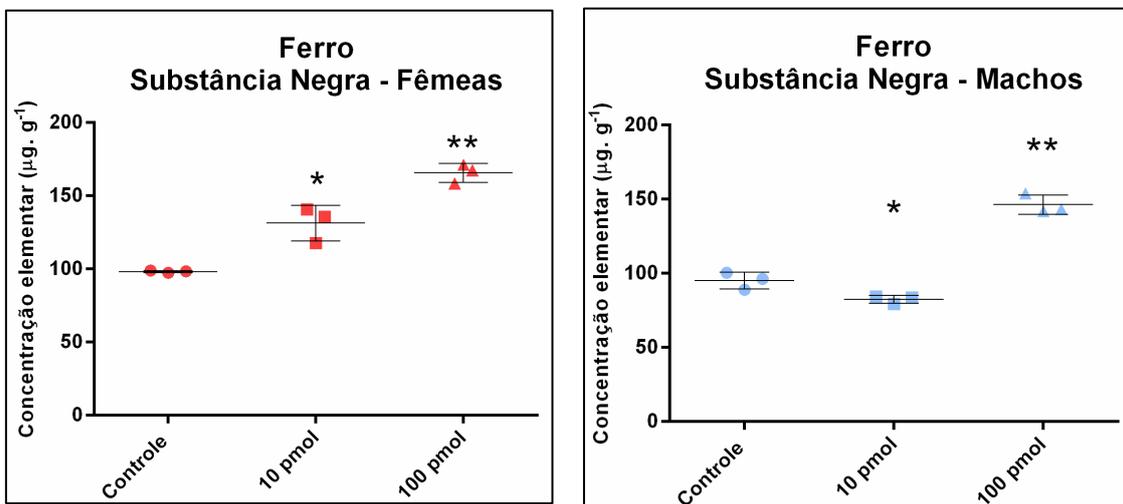


Figura 4.27 - Concentração de ferro ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

As Figuras 4.28 – 4.33 apresentam os resultados obtidos para o elemento cobre em cada uma das regiões analisadas: córtex frontal, córtex temporal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra.

Quando comparados ao controle, os valores obtidos para o córtex frontal não mostraram diferenças significativas em nenhum dos grupos estudados, como é mostrado na Figura 4.28.

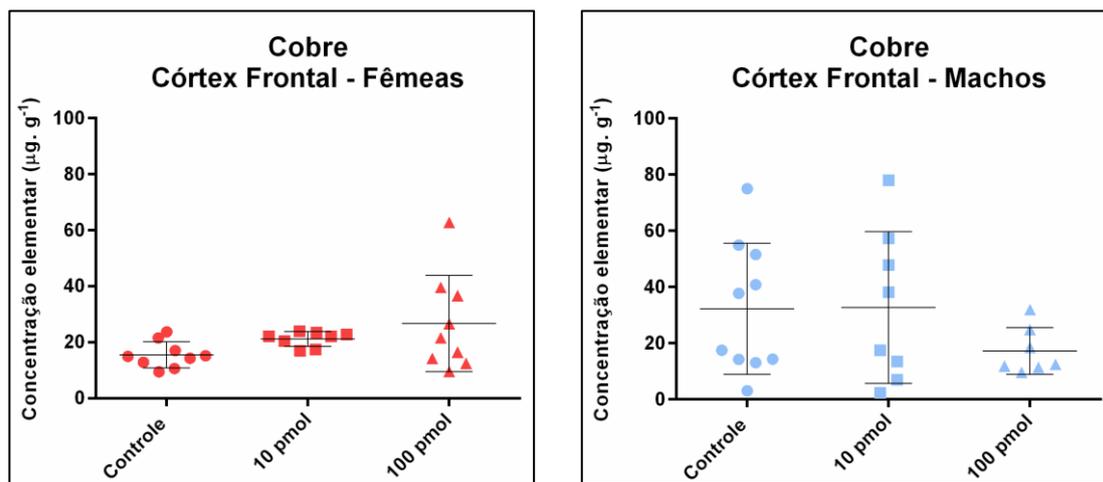


Figura 4.28 - Concentração de cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos.

Os valores de cobre obtidos no córtex temporal quando comparados ao grupo controle, apresentaram aumento apenas nas fêmeas do grupo DA10. Por outro lado, ao comparar o grupo controle dos machos com os grupos estudados, os machos não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos, como mostra a Figura 4.29.

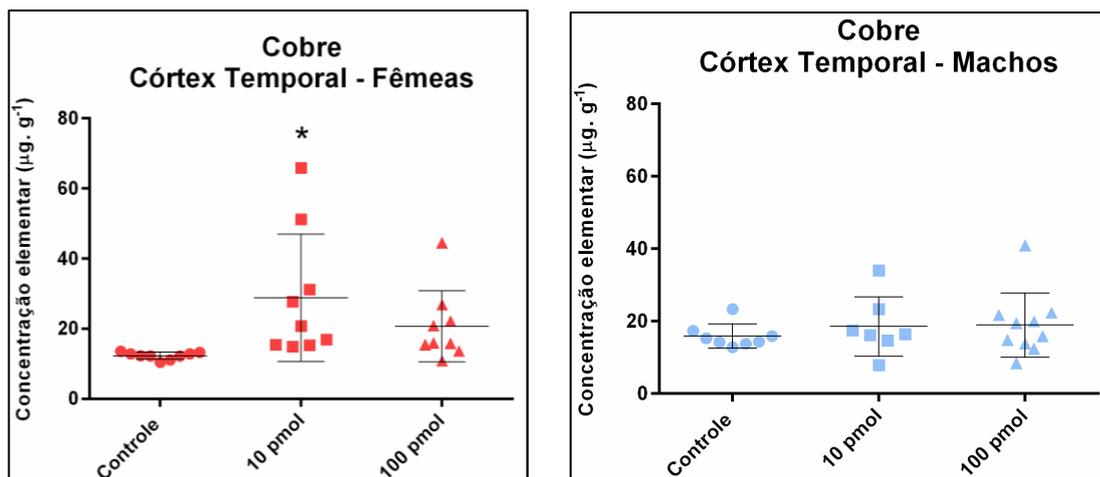


Figura 4.29 - Concentração de cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

Ao comparar os resultados do elemento cobre no hipocampo com os grupos controle, somente as fêmeas do grupo DA10 mostraram aumento na concentração. Para os demais grupos, quando comparados aos seus respectivos grupos controle, não foram observadas diferenças estatísticas, Figura 4.30.

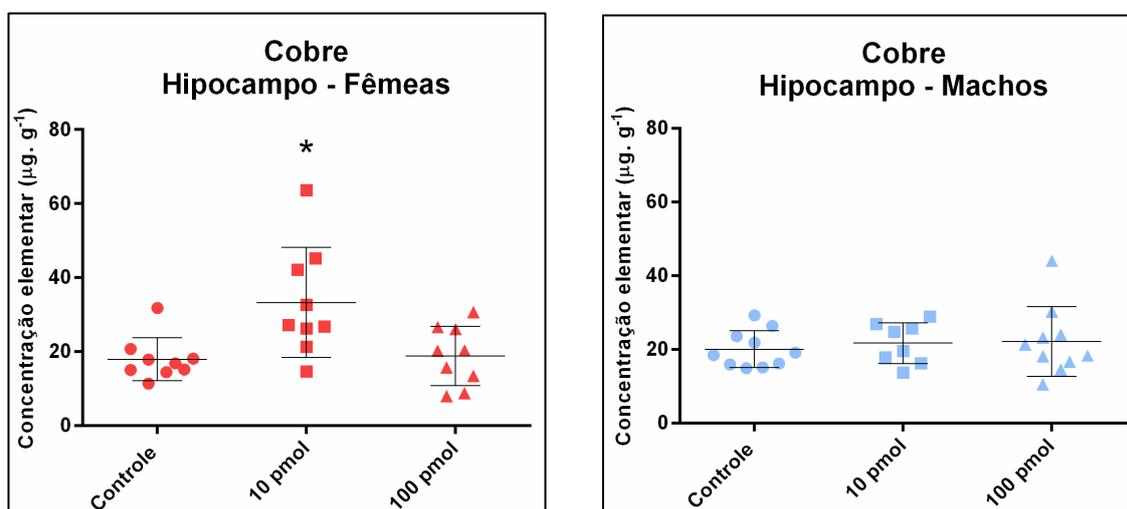


Figura 4.30 - Concentração de cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

As concentrações de cobre encontradas no hipotálamo quando comparadas ao grupo controle não mostraram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos estudados como mostrado na Figura 4.31.

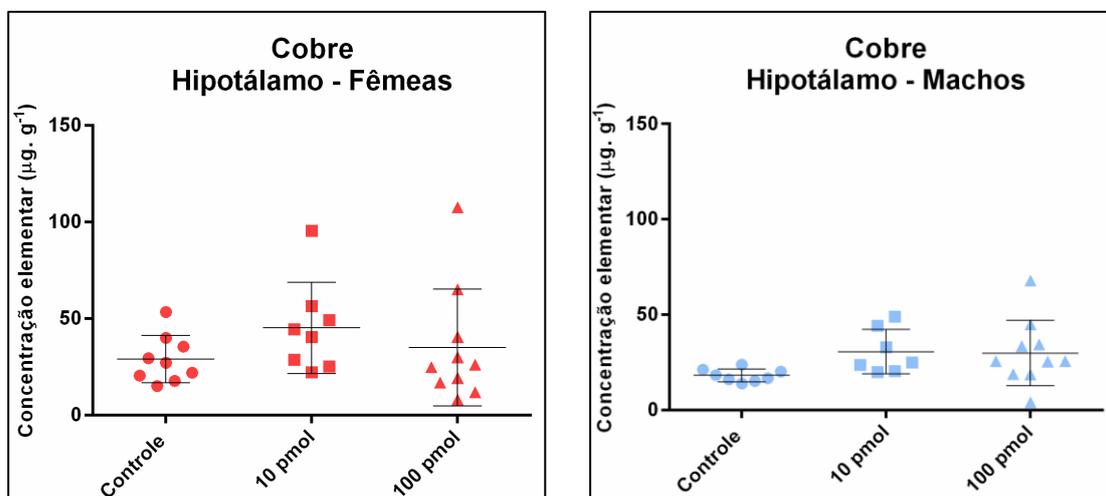


Figura 4.31 - Concentração de cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos.

Ao comparar o grupo controle com os grupos DA10 e DA100 dos machos e fêmeas, a Figura 4.32 mostra que não houve diferença estatística nos níveis de cobre no cerebelo em nenhum dos grupos, fêmeas e machos.

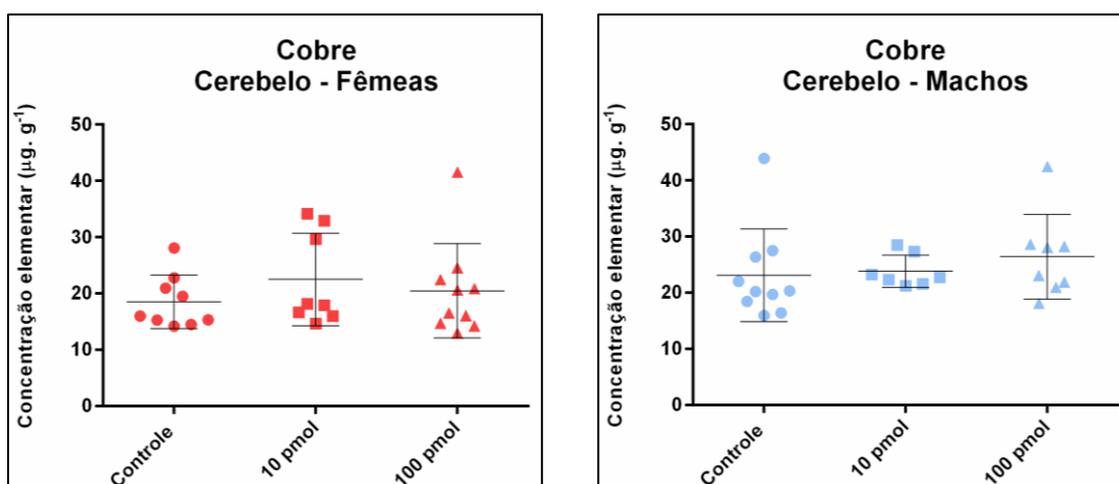


Figura 4.32 - Concentração de cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos.

A Figura 4.33 mostra os valores obtidos para o cobre na substância negra. Ao comparar os resultados obtidos para os grupos DA10 e DA100, de machos e fêmeas, com seus respectivos grupos controle, foi observada diferença estatística, aumento na concentração de cobre, apenas no grupo DA10 de fêmeas.

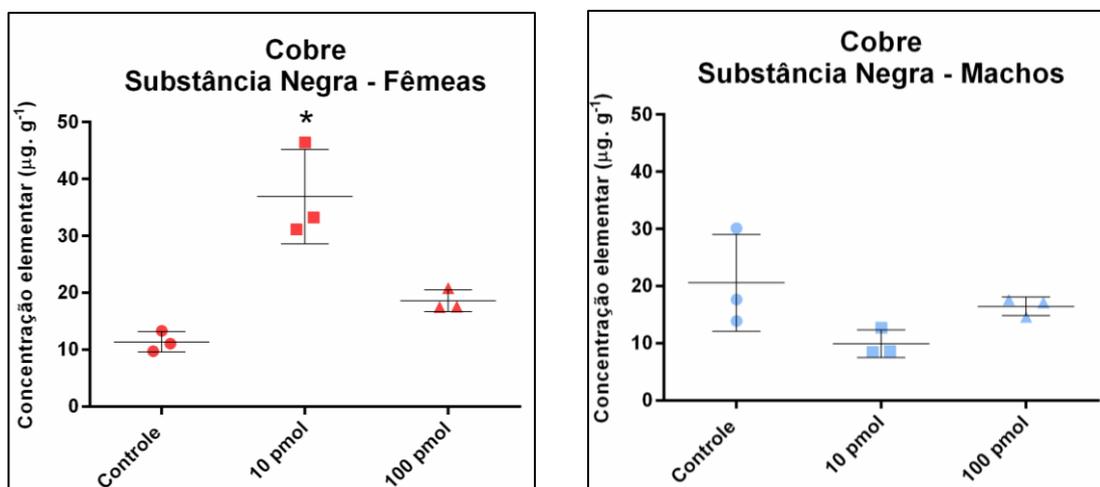


Figura 4.33 - Concentração de cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

As Figuras 4.34 – 4.39 apresentam os resultados obtidos para o elemento zinco em cada uma das regiões analisadas: córtex frontal, córtex temporal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra.

Conforme mostrado na Figura 4.34, houve diferença estatística entre os grupos DA100 e o grupo controle, tanto nas fêmeas quanto nos machos, onde foram observados aumento nas concentrações de zinco no córtex frontal.

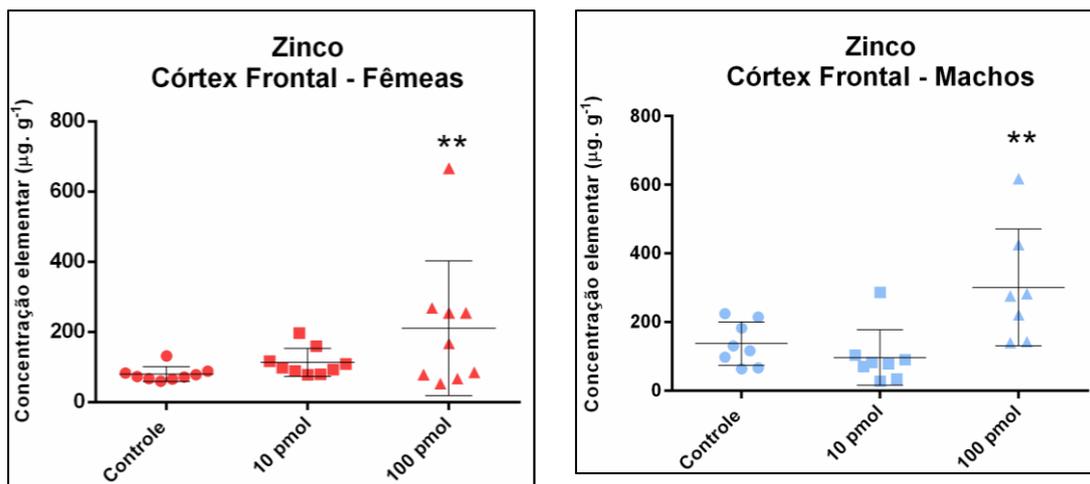


Figura 4.34 - Concentração de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

O córtex temporal mostrou significativa diferença na concentração de zinco apenas no grupo DA100 das fêmeas, quando comparado ao grupo controle, observando-se aumento neste elemento.

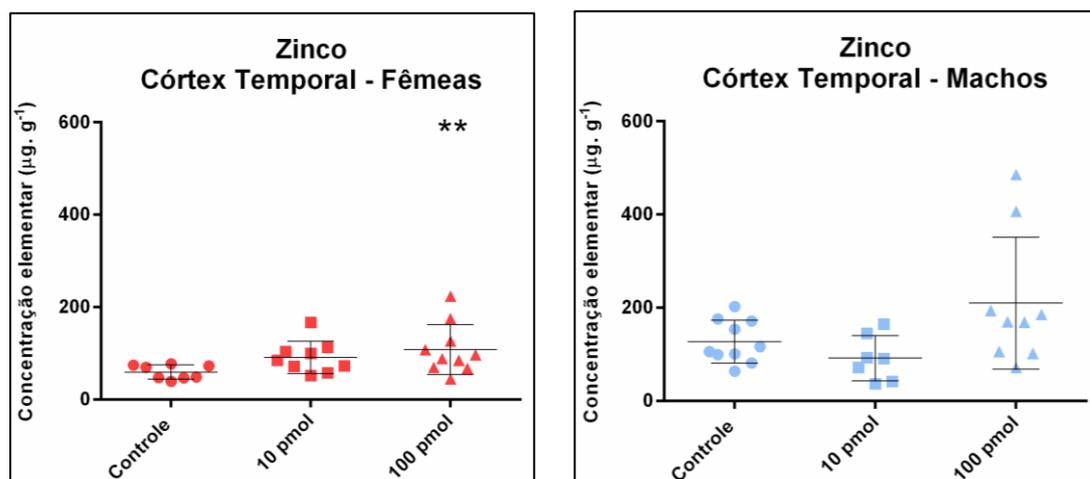


Figura 4.35 - Concentração de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Na figura 4.36, são apresentados os resultados para os níveis de zinco do hipocampo dos animais. Todos os grupos, DA10 e DA100, foram comparados aos seus respectivos grupos controle onde foi observado aumento significativo apenas no grupo DA100 dos machos.

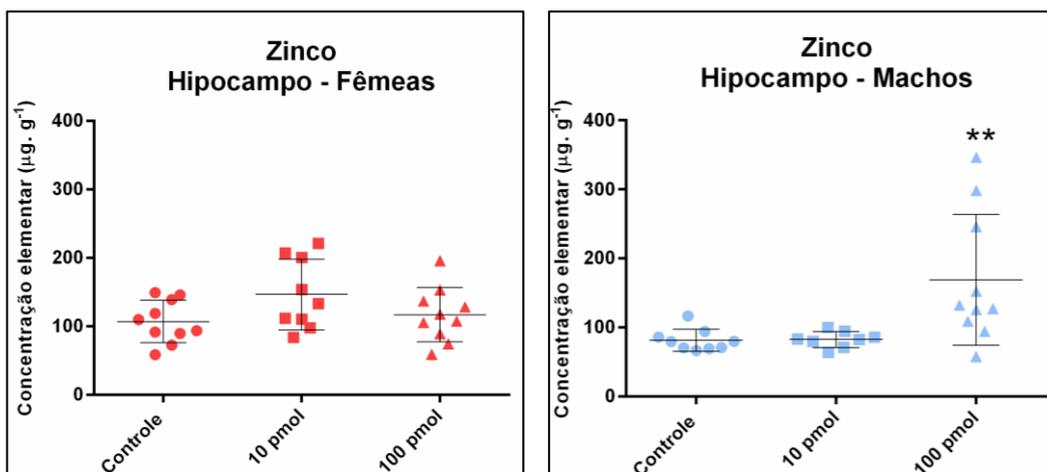


Figura 4.36 - Concentração de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Os resultados do elemento zinco obtidos no hipotálamo quando comparados ao grupo controle só mostraram diferença estatística para o grupo DA100 das fêmeas. Por outro lado, os machos não mostraram qualquer diferença quando comparados ao controle como mostra a Figura 4.37.

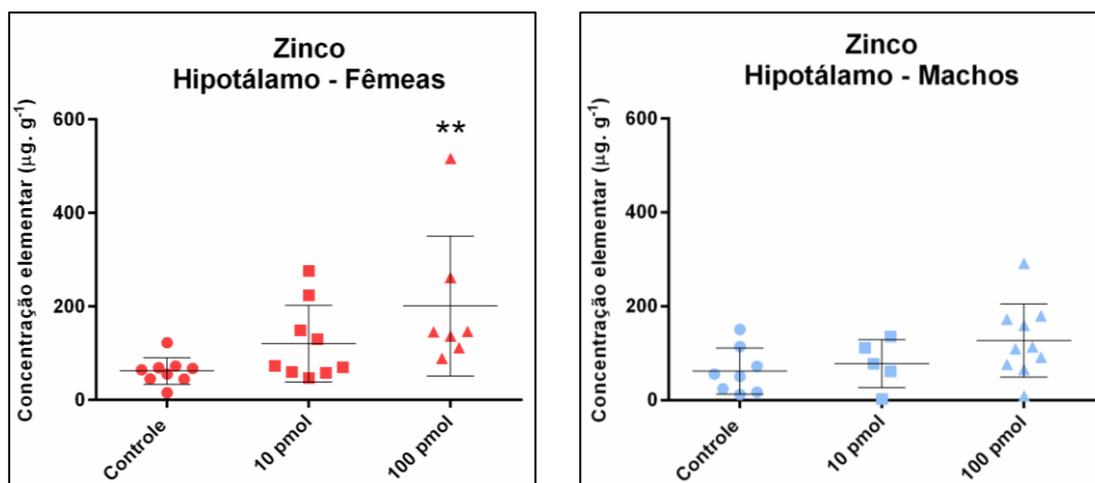


Figura 4.37 - Concentração de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

Como mostrado na Figura 4.38, não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de zinco do cerebelo em nenhum dos grupos quando comparados aos seus respectivos grupos controle.

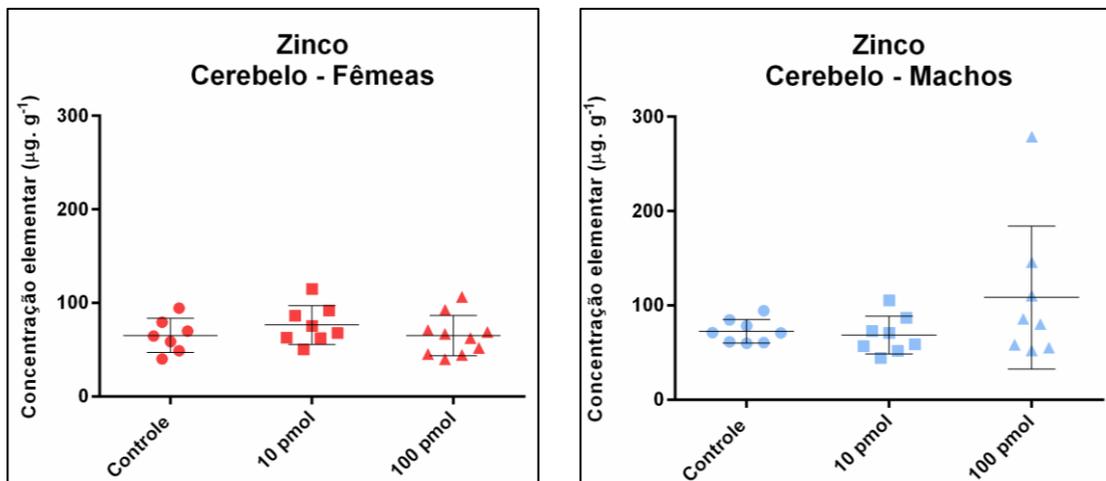


Figura 4.38 - Concentração de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos.

Os valores de zinco na substância negra dos grupos DA10 e DA100, tanto de fêmeas quanto de machos, foram comparados com os valores obtidos no grupo controle, Figura 4.39. Entretanto, somente as fêmeas mostraram diferença estatística, o grupo DA10 mostrou aumento na concentração de zinco, enquanto o grupo DA100 mostrou redução.

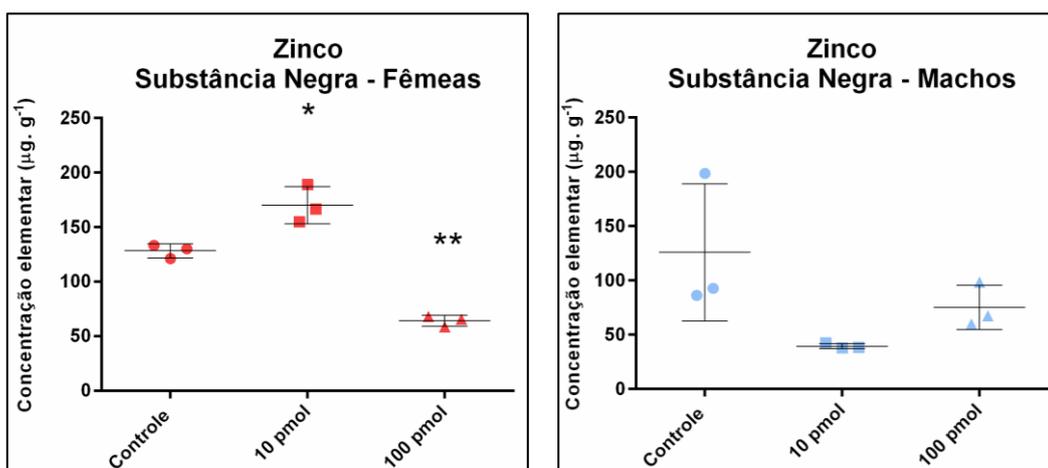


Figura 4.39 - Concentração de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

As Figuras 4.40 – 4.45 apresentam os resultados obtidos para o elemento rubídio em cada uma das regiões analisadas: córtex frontal, córtex temporal, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e substância negra.

Foi encontrada diferença estatística no elemento rubídio do córtex frontal apenas no grupo DA10 de fêmeas quando comparado ao grupo controle, houve aumento na concentração deste elemento conforme mostra a Figura 4.40.

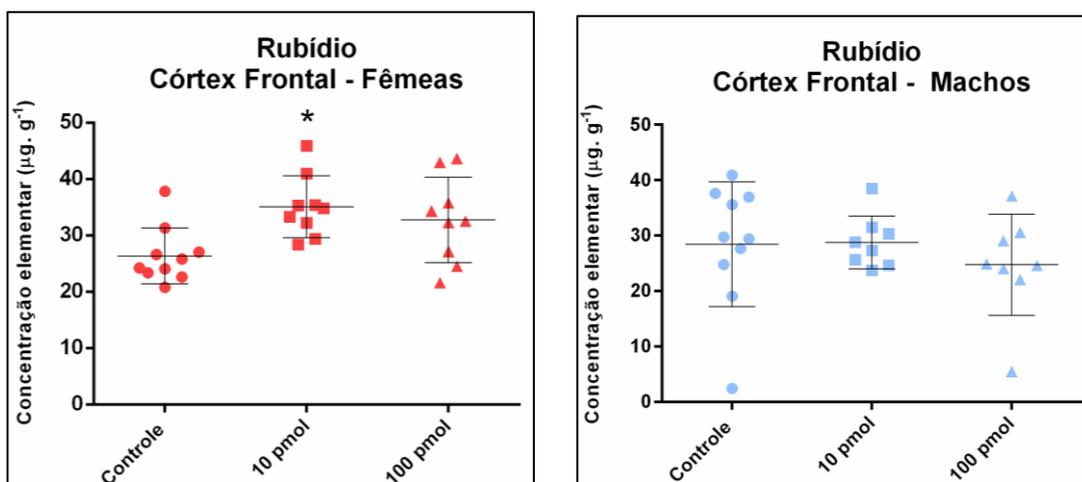


Figura 4.40 - Concentração de rubídio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex frontal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

Os resultados do córtex temporal para o elemento rubídio são mostrados na Figura 4.41, onde é possível verificar que foram encontradas diferenças estatísticas tanto nas fêmeas quanto nos machos quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Houve aumento na concentração de rubídio nos grupos DA10 e DA100 de fêmeas, enquanto que no grupo DA100 de machos, houve redução da concentração deste elemento.

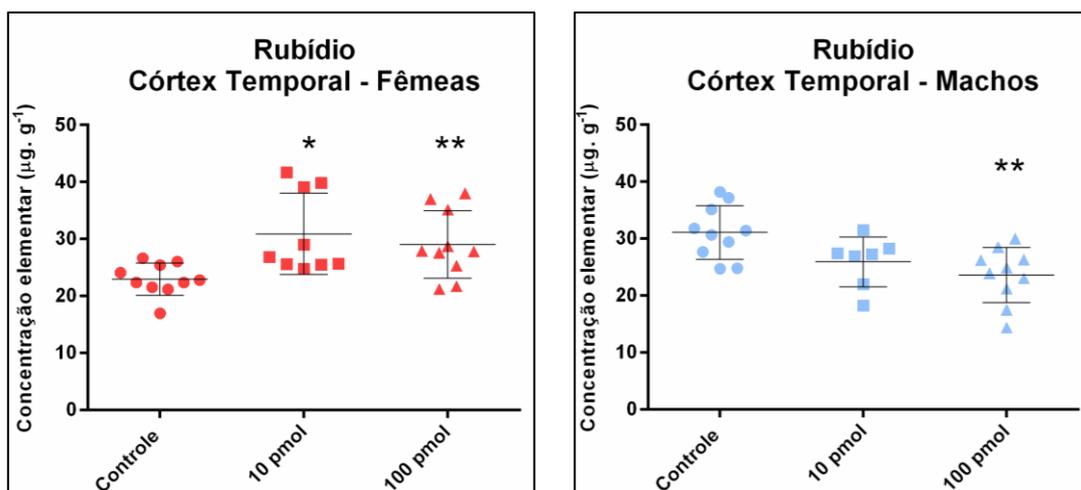


Figura 4.41 - Concentração de rubídio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no córtex temporal de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

A Figura 4.42 mostra os resultados obtidos para o rubídio no hipocampo de fêmeas e machos. Estes resultados, quando comparados com os respectivos grupos controle, mostraram diferenças estatísticas no grupo DA10 de fêmeas, houve aumento nos níveis de rubídio. Enquanto que, as diferenças encontradas no grupo de machos mostraram redução nos níveis de rubídio no grupo DA100.

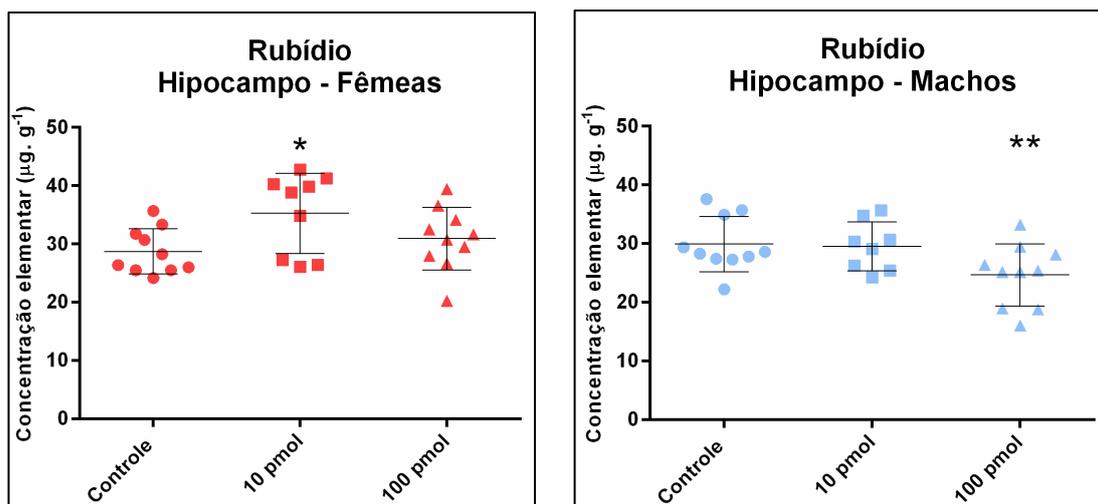


Figura 4.42 - Concentração de rubídio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipocampo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

O elemento rubídio mostrou diferença estatística no hipotálamo, quando comparado ao grupo controle, apenas no grupo DA10 de fêmeas, foi observado aumento nos níveis de rubídio.

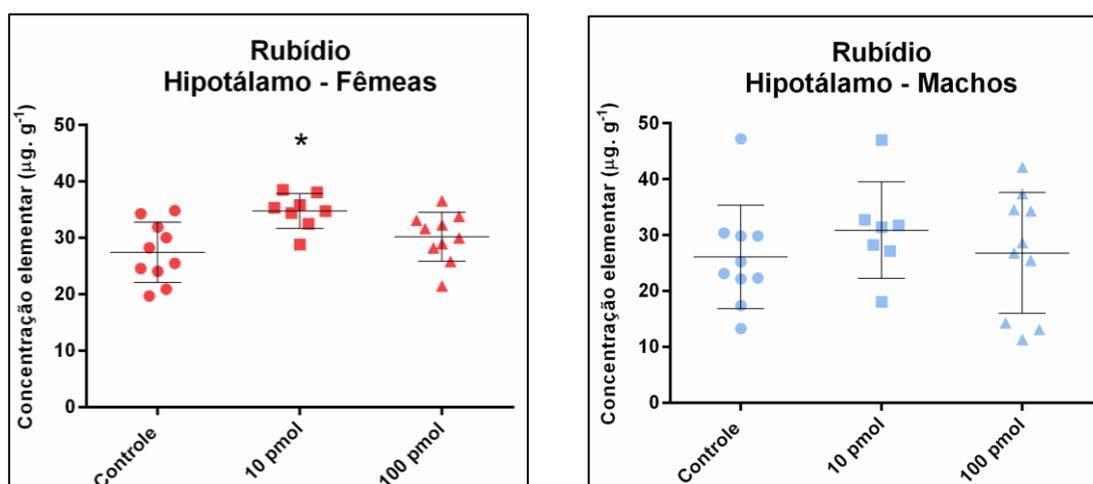


Figura 4.43 - Concentração de rubídio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no hipotálamo de camundongos suíços, fêmeas e machos.

O cerebelo apresentou redução nos níveis de rubídio em relação ao grupo controle apenas nos machos, em ambos os grupos estudados, DA10 e DA100, Figura 4.44.

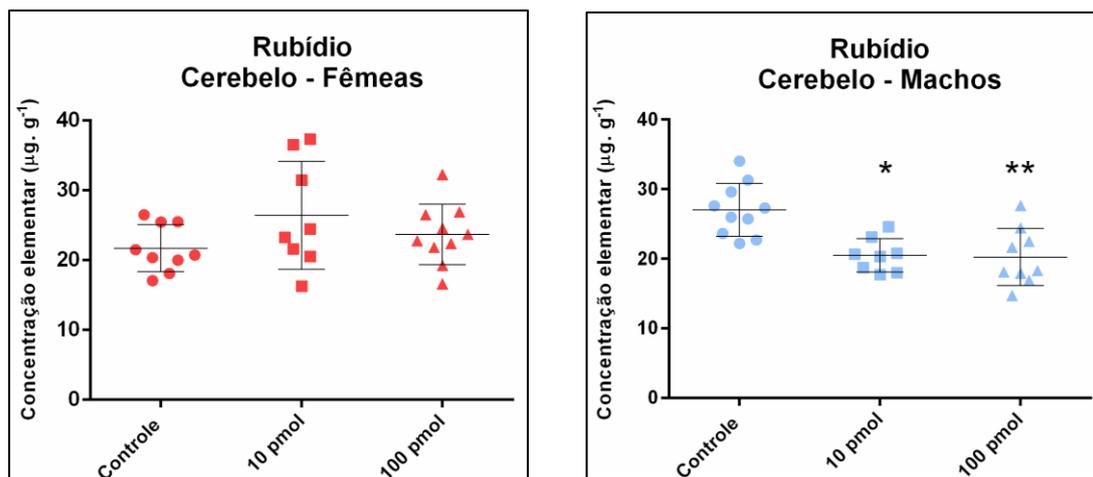


Figura 4.44 - Concentração de rubídio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no cerebelo de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

A Figura 4.45 mostra os resultados da substância negra para o elemento rubídio. Quando comparados com os resultados do grupo controle, são encontradas diferenças apenas nos machos havendo redução na concentração de rubídio.

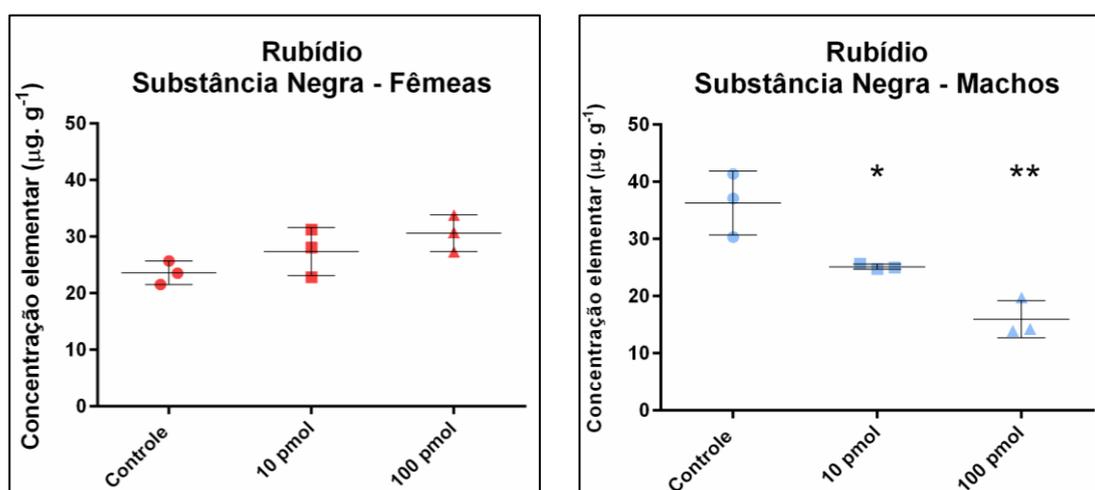


Figura 4.45 - Concentração de rubídio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na substância negra de camundongos suíços, fêmeas e machos, onde: (*) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA10 e o grupo controle e (**) significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o DA100 e o grupo controle.

IV. 1.5 Discussão dos Resultados da Análise por TXRF

Os elementos traços desempenham importantes funções nos sistemas biológicos como componentes essenciais da regulação das funções intracelulares. Além disto, a concentração destes elementos está relacionada a funções específicas no cérebro e o déficit de elementos como ferro, cobre e zinco no organismo pode ocasionar doenças devido a carência destes elementos, entretanto, altas concentrações também podem causar reações tóxicas ao organismo (LIPPARD *et al.*, 1994). Alguns íons estão diretamente envolvidos na patogênese de doenças neurológicas relacionadas a idade e a relação entre a mudança na concentração destes elementos e as desordens neurológicas tem sido demonstrada (ADRÁSI *et al.*, 2005, CANZONIERO *et al.*, 2005, MATTSON, 2007).

Entre os elementos que desempenham funções nos sistemas biológicos o fósforo é um elemento abundante no cérebro humano (ANDRÁSI *et al.*, 1995) e é essencial para controlar numerosos processos fisiológicos do corpo humano, um exemplo disto é que o metabolismo cerebral requer um nível adequado de fósforo (TAKEDA *et al.*, 2012, LI *et al.*, 2017). O fósforo está presente na patogênese da DA em diversos processos importantes como na hiperfosforilação da proteína Tau e no acúmulo de A β (YUMOTO *et al.*, 2009, BLOOM *et al.*, 2014). Foi demonstrado que o fósforo interage com o peptídeo amiloide e o microtúbulo associado à proteína Tau, afetando assim o processo de agregação do A β e da Tau (WASIAK, *et al.*, 2012). A deposição cerebral de A β na DA está fortemente associada à Taupatia, que é caracterizada pela hiperfosforilação da Tau em cérebros de pacientes com a DA (BLOOM *et al.*, 2014). O A β induz a fosforilação da Tau desencadeando a desestabilização dos microtúbulos levando ao comprometimento do transporte axonal e a morte neuronal (TAKASHIMA *et al.*, 1998). A hiperfosforilação da Tau também contribui com a neurodegeneração induzida pelo A β levando a perda de neurônios colinérgicos (ZHENG *et al.*, 2002). Andrási, em 2005, analisando cérebros de pacientes com a DA utilizando ICP-AES, com limite detecção de 10 $\mu\text{g/g}$, mostrou que em diversas regiões do cérebro de pacientes com DA há redução nos níveis de fósforo principalmente no córtex. Enquanto que neste estudo, utilizando a TXRF com um limite de detecção de 4 $\mu\text{g/g}$ para o fósforo, foi possível, assim como Andrási, 2005, observar em camundongos suíços com a DA experimental induzida por oligômeros uma redução no nível de fósforo nos machos em ambos os grupos estudados, DA10 e DA100, nas seguintes regiões: córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e substância negra. Por outro lado, nas fêmeas foi observado aumento nos níveis de fósforo nos córtex frontal e

temporal, hipocampo, hipotálamo e substância negra em ambos os grupos estudados. Entretanto, os resultados obtidos por Andrási, 2005, não faz distinção entre o sexo dos pacientes estudados não permitindo assim que se faça uma análise em relação as alterações observadas nos cérebros estudados e o sexo do paciente. Por outro lado, estudos recentes propuseram que o aumento nos níveis de fósforo aumenta o risco de desenvolvimento da DA (BASHEER *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017). Baseados nos resultados obtidos neste trabalho e em outros trabalhos (ANDRÁSI *et al.*, 1995, ANDRÁSI *et al.*, 2005, BASHEER *et al.*, 2016, WASIAK, *et al.*, 2012, LI *et al.*, 2017) é sugerido que a homeostase alterada de fósforo é induzida pelo A β Os no cérebro dos animais estudados, não fazendo parte do envelhecimento normal e, sim, de um processo patológico que pode levar a neurodegeneração. Esta mudança nos níveis de fósforo pode também estar relacionada ao gênero do animal.

Os canais de potássio são conhecidos por serem essenciais na regulação da excitação neuronal e por desempenhar importante papel na aprendizagem e memória (INAN *et al.*, 2012). Evidências encontradas na literatura sugerem que o A β pode influenciar a homeostase celular e a sinalização neuronal através da modulação de funções dos canais de potássio (CHONG-BO *et al.*, 2004). Tem sido reportado por diversos grupos de pesquisa que o aumento do fluxo de potássio (K⁺) pode desempenhar um papel importante na patogênese da morte neuronal induzida pelo A β e no comprometimento da memória relacionada a esta morte neuronal (PAN *et al.*, 2004), ao mesmo tempo uma das características clínicas da DA é o comprometimento cognitivo progressivo devido à morte neuronal. Os resultados obtidos neste estudo para as concentrações de potássio mostraram um aumento, nas fêmeas, no córtex frontal e temporal, hipocampo, hipotálamo e substância negra, enquanto que, para os machos, foi observado uma redução nos níveis de potássio no córtex temporal, hipocampo, cerebelo e substância negra. Durán-González, 2015, mostrou que o A β pode levar a redução da expressão do gene de um canal em particular, demonstrou também que em ratos os genes dos canais de potássio são suscetíveis a influência do A β oligomérico. Mudanças na função dos canais e o dano neuronal podem envolver múltiplas vias que levam ao estresse oxidativo, característica da DA. Além disto, estudos também mostraram que mudanças nos níveis de potássio no fluido intersticial do cérebro influencia a geração de potenciais de ação em neurônios e, portanto, afetam diretamente as funções neuronais e sinápticas (ZLOKOVIC, 2008). Assim, os resultados encontrados para os níveis de potássio estão

em concordância com estudos que mostram que os níveis deste elemento se encontram alterados em cérebros com DA.

Na DA, várias espécies de A β foram caracterizadas como causadores de estresse oxidativo. Estas espécies A β podem gerar ROS que participam do mecanismo de neurotoxicidade (HENSLEY *et al.*, 1994). O A β contém um único resíduo de metionina, e Butterfield, 2010 e 2013, sugeriu que o estresse oxidativo associado ao A β é dependente da formação de um radical livre transiente centrado no enxofre envolvendo essa metionina. Por sua vez, este resíduo leva à peroxidação lipídica e oxidação proteica em neurônios. A oligomerização e a deposição de A β mostram certa dependência desta metionina (BUTTERFIELD *et al.*, 2010). Assim, estudos indicam que, dentro do peptídeo A β , a metionina desempenha um papel crítico no dano oxidativo associado a DA. Como esperado, os resultados encontrados neste estudo mostraram diferenças estatísticas nos níveis de enxofre para os machos e fêmeas em ambos os grupos, DA10 e DA100. Os machos mostram uma redução nos níveis de enxofre no hipocampo e substância negra, mas novamente, os grupos machos e fêmeas mostraram-se diferentes, as fêmeas tiveram um aumento nos níveis de enxofre nas seguintes regiões: córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e substância negra. BARNHAM, em 2003, mostrou que a oxidação do enxofre desta metionina modifica a agregação A β e propôs que tanto o oxigênio molecular quanto o cobre podem ser a chave na oxidação do enxofre desta metionina. Diversos estudos mostraram que o aumento da toxicidade do cobre está relacionado a agregação de A β devido ao cobre presente na sinapse neuronal (VILLES, 2012, PAOLETTI *et al.*, 2009). Os níveis de cobre neste estudo nas fêmeas mostraram um aumento nas seguintes regiões: córtex temporal, hipocampo e substância negra. Assim, o aumento nos níveis de enxofre e cobre, observado nas fêmeas nas mesmas regiões, corrobora com os resultados de Barnham, 2003, em que as alterações nestes níveis podem estar, possivelmente, relacionadas com a oxidação do enxofre desta metionina.

A regulação alterada dos níveis de ferro, cobre e zinco é uma característica bem estabelecida da DA (BUSH *et al.*, 2013, KOZLOWSKI *et al.*, 2012). A homeostase dos íons metálicos é muito importante e pequenas variações nas concentrações podem fazer com que efeitos benéficos se tornem efeitos tóxicos dentro das células (KEPP, 2017). Bush, 2013, mostrou que a modificação na homeostase dos metais leva não apenas à agregação e deposição de A β , mas também ao acúmulo de ferro nos neurônios, o que acaba levando à lesão oxidativa e conseqüentemente a neurodegeneração. Era de se esperar que a neurotoxicidade fosse uma função da concentração de ferro, cobre e zinco.

De fato, um crescente número de evidências indica que a presença de íons metálicos altera a via cinética do A β , direcionando a sua agregação e levando a formação de estruturas mais neurotóxicas (HANE *et al.*, 2014). Neste estudo, observou-se nas fêmeas, aumento nos níveis de ferro e cobre nas seguintes regiões: córtex temporal, hipocampo e substância negra. Por outro lado, nos machos foram observadas alterações apenas nos níveis de ferro na substância negra. Na DA, o cobre e o ferro estão diretamente ligados a produção de ROS, que induz o estresse oxidativo e a inflamação do cérebro de pacientes com Alzheimer (ESKICI *et al.*, 2012). O estresse oxidativo é um dos primeiros sinais da DA (PAOLETTI *et al.*, 2009) surgindo antes mesmo da inflamação e das placas amiloides. Além disto, estudos anteriores mostraram que o A β O promove o estresse oxidativo neuronal (DURÁN-GONZÁLES *et al.*, 2015, DE GODOY *et al.*, 2017). Desta forma, alterações observadas, neste estudo, nos níveis de ferro e cobre em algumas regiões dos cérebros de camundongos suíços estão de acordo com estudos anteriores e corroboram com os resultados que indicam que o A β O promove, pelo menos em células de cultura, o estresse oxidativo (DE FELICE *et al.*, 2007, SARAIVA *et al.*, 2010, BRITTO-MOREIRA *et al.*, 2017).

Já foi estabelecido na literatura que as placas A β são ricas em íons metálicos (PAOLETTI *et al.*, 2009), e que a deposição de amiloide no cérebro ocorre nas fendas das sinapses glutamatérgicas, fendas estas que estão envolvidas na potencialização a longo prazo. Estudos anteriores mostraram que as fendas sinápticas são repositórios de cobre e zinco (BUSH *et al.*, 2013, KOZLOWSKI *et al.*, 2012, MILLER *et al.*, 2005). Quando estes íons metálicos se encontram com o A β , é dado início a uma série de eventos que envolvem a interação destes íons com o peptídeo e que podem levar a toxicidade do radical livre do cobre. Por outro lado, o zinco suprime a neurotoxicidade induzida pelo A β ao precipitar seletivamente em agregados intermediários do A β . Nuttal, 2014, propôs que o aumento das concentrações locais de zinco implica em mecanismos patológicos que contribuem para a DA. Três mecanismos principais de como o excesso de zinco contribui para o avanço da DA foram propostos por Nuttall, 2014. O primeiro mecanismo propõe que o zinco se acumula ligando-se ao A β nas sinapses secretoras de zinco, levando a formação de oligômeros e fibrilas que formam placas senis resistentes à protease. Os oligômeros A β estimulam os receptores de glutamato sensível ao N-metil-D-aspartato (dependente de NMDAR) aumentando o cálcio celular e levando à ativação da NADPH-oxidase (NOX) síntese de óxido nítrico (NOS) gerando espécies oxidantes (ânion superóxido e óxido nítrico). Além disto, no hipocampo, bem como em outras regiões do

cérebro as vesículas de zinco estão localizadas nos neurônios utilizando o glutamato como neurotransmissor. O glutamato é o principal neurotransmissor de aminoácidos excitatórios do hipocampo e do córtex (CUAJUNGO *et al.*, 1997). O zinco é liberado na fenda sináptica dos neurônios glutamatérgicos juntamente com o glutamato, onde interage e modula a atividade das sinapses glutamatérgicas, podendo atuar como um neurotransmissor por si só. Assim, a regulação alterada do zinco pode contribuir para o desenvolvimento da DA (WATT *et al.*, 2011). O segundo mecanismo propõe que o zinco pode inibir a atividade da ferroxidase em exportar o ferro da proteína precursora amiloide (APP), levando ao acúmulo de ferro nos neurônios e potencialmente ao estresse oxidativo. O último mecanismo propõe que o zinco estimula quinases e inibe as fosfatases proteicas levando à fosforilação da Tau que conseqüentemente, leva a agregação da Tau em emaranhados neurofibrilares (NFT) e contribui para uma realimentação positiva que aumenta ainda mais o influxo de cálcio pós-sináptico resultando na morte celular neuronal. Neste estudo, os níveis de zinco apresentaram aumento no córtex frontal e temporal, e no hipotálamo para as fêmeas, enquanto que na substância negra de fêmeas, os níveis de zinco aumentaram para o DA10 e diminuíram para o grupo AD100. Para os machos, os níveis de zinco apresentaram aumento no córtex frontal e no hipocampo em ambos os grupos estudados, DA10 e DA100. Assim, os resultados obtidos neste estudo concordam com resultados anteriores que mostram que níveis elevados de zinco levam à neurodegeneração e contribuem para o desenvolvimento da DA (WEISS *et al.*, 2000, WATT *et al.*, 2011, NUTALL *et al.*, 2014).

IV 2. Análise Qualitativa por μ SRXRF

IV. 2.1 Resultados da Análise por μ SRXRF

Com a técnica de μ SRXRF foi possível determinar a presença dos elementos P, S, K, Ca, Ti, Fe, Cu e Zn nos cérebros estudados. A Figura 4.46 mostra o espectro de fluorescência de um único ponto de uma fatia de cérebro de camundongo analisada.

Observa-se que o elemento argônio está presente no espectro tendo em vista que o experimento foi realizado em atmosfera normal que possui aproximadamente 1% de Ar. O elemento Ti, observado no espectro, é devido ao material do equipamento utilizado para obtenção do espectro. Foi observado também o elemento cálcio que não foi utilizado na análise, pois apresentou valores abaixo do limite de detecção. Por outro lado, o K

observado no espectro apresentou valores muito elevados, saturando a imagem e dificultando a análise, pois foi utilizado o valor obtido na superfície de toda a fatia. Sendo assim, não foram apresentados os resultados obtidos para o elemento K.

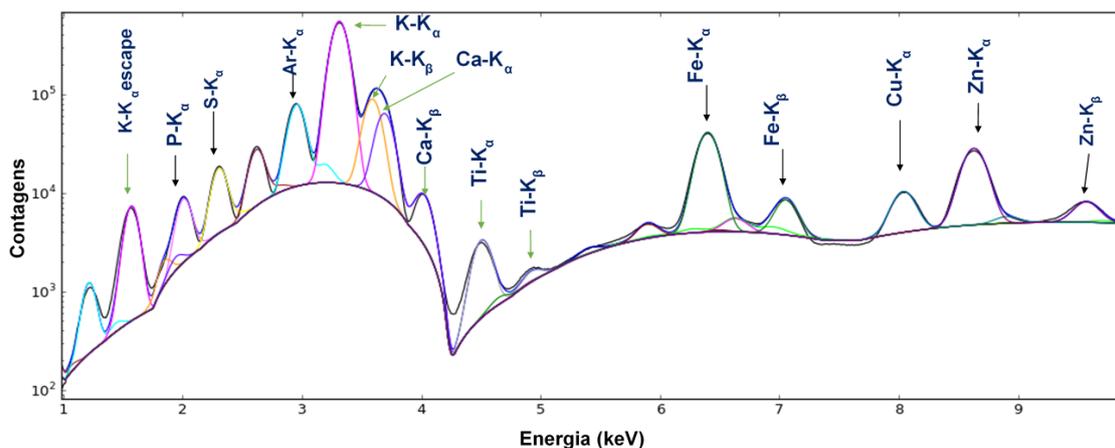


Figura 4.46 – Espectro de fluorescência de raios X de uma fatia de cérebro de camundongo suíço.

A Tabela 4.3 apresenta a mediana e a amplitude da distribuição elemental nas fatias de cérebro dos grupos controle e experimentais DA10 e DA100.

Tabela 4.3 – Distribuição elemental nas fatias de cérebro.

Elemento	Intensidade					
	Controle		AD10		AD100	
	Mediana	Amplitude	Mediana	Amplitude	Mediana	Amplitude
P	16	7	15	4	14	4
S	36	8	35	8	30	6
Fe	1149	32	112	44	68	15
Cu	25	5	28	12	18	6
Zn	90	14	93	32	58	13

*diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$)

A Tabela 4.4 apresenta os níveis de significância (p-valor) utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Considera-se que um p-valor menor ou igual a 0,05 indica que há diferenças significativas entre os grupos comparados. Os resultados encontrados mostraram que os níveis de ferro, cobre e zinco das fatias analisadas do grupo DA100 reduziram em relação as concentrações do grupo controle, mostrando que houve diferença estatística significativa neste grupo. Por outro lado, o grupo experimental DA10, quando comparado ao grupo controle, não mostrou diferença estatística significativa.

Tabela 4.4 – P-valor da comparação entre os grupos com DA e o grupo controle utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

El.	Comparação	p-valor
P	Controle – DA10	1,00
	Controle – DA100	0,75
S	Controle – DA10	1,00
	Controle – DA100	0,15
Fe	Controle – DA10	1,00
	Controle – DA100	0,02*
Cu	Controle – DA10	0,16
	Controle – DA100	0,05*
Zn	Controle – DA10	1,00
	Controle – DA100	0,03*

Teste Kruskal-Wallis

*diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$)

As Figuras 4.47-4.51 apresentam imagens representativas da distribuição elementar fósforo, ferro, cobre e zinco em fatias de cérebro dos grupos controle, DA10 e DA100, respectivamente.

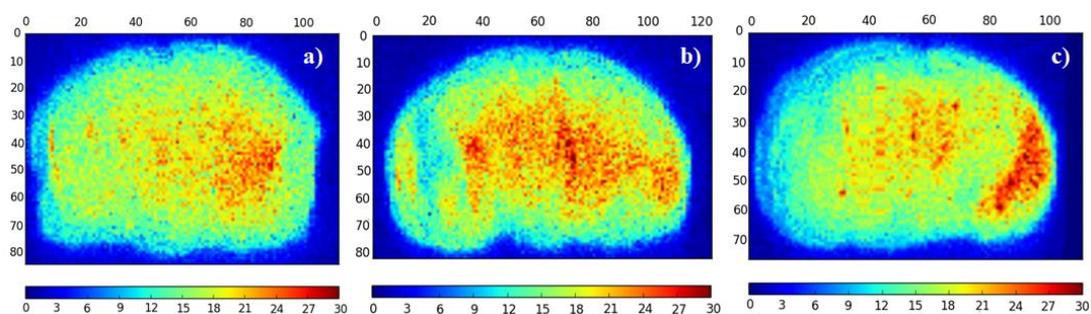


Figura 4.47 – Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100

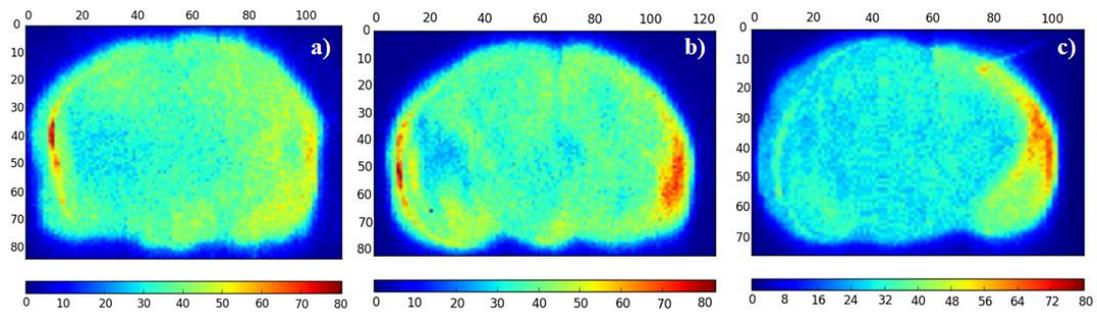


Figura 4.48 – Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do enxofre nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100

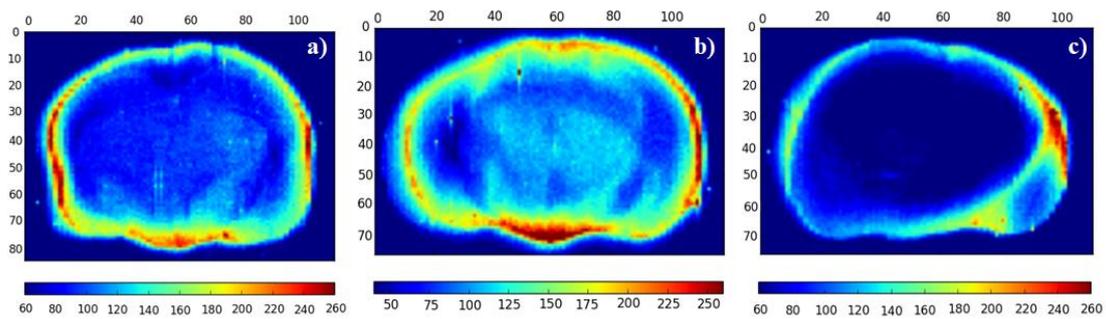


Figura 4.49 – Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do ferro nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100

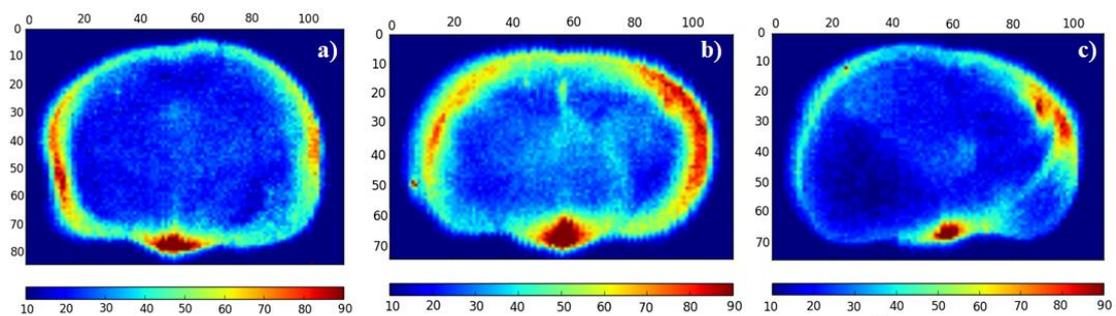


Figura 4.50 – Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do cobre nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100

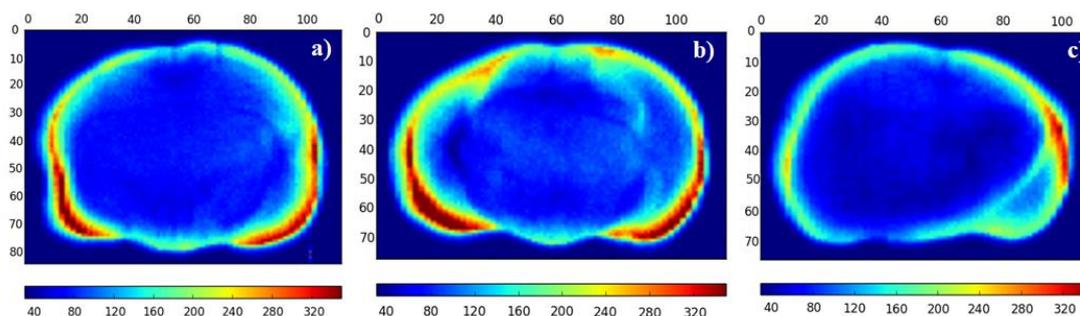


Figura 4.51 – Imagens representativas do mapeamento bidimensional da distribuição do zinco nas fatias de cérebro: a) controle, b) DA10 e c) DA100

IV.2.2 Discussão dos Resultados da Análise por μ SRXRF

Nos resultados obtidos para os camundongos machos utilizados na análise por μ SRXRF não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas nos níveis de P e S nas fatias dos grupos DA 10 e DA100. Por outro lado, os resultados mostraram diferenças significativas nos níveis de ferro, cobre e zinco nas fatias do grupo DA100 quando comparados aos do grupo controle. Embora, estes elementos tenham reduzido significativamente nos grupos DA100, não foram encontradas diferenças estatísticas em sua distribuição no grupo DA10.

Os elementos traços são distribuídos de forma heterogênea no cérebro e a concentração destes elementos está relacionada a funções específicas e mudança nestas concentrações tem sido correlacionada a desordens neurológicas (FIGUEIREDO, 2011). Como dito anteriormente, a homeostase alterada dos íons metálicos é uma característica bem estabelecida da DA (BUSH, 2013, KOZLOWSKI *et al.*, 2012) e pequenas variações nestas concentrações podem causar reações tóxicas dentro das células (KEPP *et al.*, 2017). Alterações na homeostase metálica não só levam à agregação e deposição de A β , como também levam a acumulação de ferro dentro dos neurônios, causando lesões oxidativas e neurodegeneração (BUSH, 2013). O estresse oxidativo e a inflamação do cérebro dos pacientes com Alzheimer foi associado ao ferro e ao cobre devido a geração de ROS (ESKICI, 2012). Conforme já discutido, o estresse oxidativo é um dos primeiros sinais da DA precedendo a presença de placas amiloides e a inflamação (ANSARI *et al.*, 2010).

As placas A β são ricas em íons metálicos e as fendas sinápticas sítios de ligação de cobre e zinco (KOZLOWSKI *et al.*, 2012, BUSH, 2013, MILLER *et al.*, 2006). A

deposição das placas amiloide dentro do cérebro se dá nas fendas das sinapses glutamatérgicas (OPAZO *et al.*, 2002). Quando os íons metálicos se encontram com o β -amiloide, ocorre uma série de eventos que envolve a interação destes íons metálicos com o peptídeo que podem levar a geração de ROS e à toxicidade de radicais livres relacionada ao cobre. O zinco é capaz de reduzir a neurotoxicidade induzida pelo $A\beta$ através da precipitação seletiva de estados intermediários dos agregados de $A\beta$. No entanto, em níveis elevados a ligação entre o Zn e o $A\beta$ pode aumentar a formação de agregados $A\beta$ fibrilar levando a neurodegeneração (WEISS *et al.*, 2000).

Os resultados encontrados na análise por μ SRXRF mostraram uma redução nos níveis de Fe, Cu e Zn, enquanto que, os resultados encontrados na literatura mostram aumento nestes níveis. No entanto, os resultados da literatura são baseados em cérebros pós-morte de pacientes com a DA (ANSARI *et al.*, 2010) ou baseados em modelos experimentais de camundongos transgênicos (LESKVJOVAN *et al.*, 2009).

Embora vários estudos tenham sido realizados com o objetivo de compreender o papel dos metais no desenvolvimento e avanço da DA, nenhum estudo havia sido desenvolvido no sentido de compreender o papel destes elementos no modelo experimental em que a DA é induzida por uma única injeção intracerebroventricular de $A\beta$ Os. A relevância clínica da Hipótese dos Oligômeros foi estabelecida com base em evidências onde oligômeros equivalentes estão presentes em cérebros de humanos com a DA e em cérebros de animais em modelos experimentais para a DA (FERREIRA, *et al.*, 2011). Os oligômeros $A\beta$ estimulam uma variedade de processos patológicos, que surgem logo após a injeção icv, alguns destes processos afetam especificamente as sinapses inibindo a LTP e a interferindo nos mecanismos de plasticidade sináptica (FIGUEIREDO, *et al.*, 2013). Desta forma, este estudo contribuiu para entender que a mudança na concentração elementar pode ser afetada pela presença de oligômeros solúveis da mesma forma que é afetada na hipótese amiloide, onde existem placas insolúveis. Assim, os oligômeros modificam a homeostase de elementos que podem estar influenciando o déficit de memória encontrado nos camundongos suíços com DA experimental.

CAPITULO V

CONCLUSÕES

Foi possível identificar e quantificar a concentração dos elementos: fósforo, enxofre, potássio, ferro, cobre, zinco e rubídio em cérebros de camundongos suíços com DA experimental induzida pelos A β Os utilizando-se a TXRF, e também foi possível identificar e mapear os elementos: fósforo, enxofre, ferro, cobre e zinco presentes no tecido cerebral utilizando-se a μ SRXRF. Dessa maneira, as técnicas de TXRF e μ SRXRF, mostraram-se poderosas ferramentas para identificação, quantificação e mapeamento dos elementos em amostras de cérebro por serem técnicas simples de serem aplicadas, além de possuírem um excelente custo-benefício, pois são baratas e rápidas, o que permite que sejam principalmente úteis para utilização em pesquisas biomédicas na DA.

Este trabalho mostrou que cérebros de camundongos suíços com doença de Alzheimer experimental induzida por oligômeros β -amiloides apresentaram modificação na concentração elementar, tanto em regiões encefálicas analisadas separadamente quanto nos mapas de distribuição elementar. Além disto, mostrou que a alteração ocorreu de forma diferente em machos e fêmeas apenas sete dias após a injeção icv.

Através da TXRF foi observado que, no grupo das fêmeas, houve aumento nas concentrações dos elementos estudados, por outro lado, no grupo dos machos, houve redução nos níveis gerais destes elementos em relação ao grupo controle. Estes resultados estão em concordância com os valores obtidos na análise por μ SRXRF, que mostrou redução na distribuição dos elementos nas fatias de cérebros de animais machos. Algumas das regiões encefálicas analisadas que apresentaram alteração na homeostase de elementos estão envolvidas com o aprendizado e memória e são as mais afetadas no desenvolvimento da DA.

A diferença entre os níveis de elementos observada entre machos e fêmeas no modelo experimental da DA induzida por oligômeros β -amiloide corrobora com estudos que demonstraram que a DA acaba afetando de maneira diferente homens e mulheres. Relatórios da Alzheimer's Association mostraram que 2/3 das pessoas com Alzheimer são mulheres. Desta maneira, as mulheres são as mais afetadas com desenvolvimento da DA, fazendo com que, depois da idade avançada, o gênero seja o segundo maior fator de risco para o surgimento da doença. Mosconi, 2017, mostrou que alterações ocorridas no metabolismo durante o desenvolvimento da menopausa, o climatério, podem ser associados ao Alzheimer. No climatério e na pós menopausa, as mulheres apresentam no

cérebro, redução nos níveis de glicose o que reduz o processamento de energia das células do cérebro reduzindo assim a sua eficiência. Além disto, a menopausa também foi associada ao aumento da proteína A β no cérebro. Assim, o surgimento da menopausa poderia afetar a clivagem da APP favorecendo a via amiloidogênica e, conseqüentemente, aumentando a produção do peptídeo A β que, como visto anteriormente, pode permanecer na forma solúvel, os chamados oligômeros, ou depositar-se na forma insolúvel de placas amiloides.

Deve-se observar que a existência de placa amiloide não se correlaciona bem com o declínio cognitivo da doença de Alzheimer. Assim, muito antes de as placas se depositarem nos cérebros com DA, os oligômeros solúveis já estão agindo, e é possível detectar alterações na homeostase dos elementos. Este trabalho mostrou que a concentração de A β Os, 10 e 100 pmol, injetada nos animais influenciou a maneira como a homeostase elementar foi alterada nos cérebros dos animais. Assim, não apenas a presença dos oligômeros no cérebro alteraria a homeostase elementar, mas sua concentração também determinaria a maneira como, no desenvolvimento da DA, esta alteração se dá no cérebro. Portanto, este trabalho mostrou que existe uma relação entre a concentração de A β Os no cérebro dos animais e as alterações observadas nas concentrações elementares.

Este estudo contribui para o entendimento de que os oligômeros alteram a homeostase elementar, possivelmente afetando as funções celulares/moleculares no cérebro, podendo ser a explicação para os déficits cognitivos independentemente da presença de placas amiloides, como já verificado por outros grupos de pesquisa.

Tendo em vista que a DA afeta de maneira diferente homens e mulheres, e que este estudo mostrou que a concentração elementar sofreu influência de forma diferente em machos e fêmeas e que a concentração de A β Os injetada nos animais também influenciou diferentemente a homeostase elementar dos animais, são sugestões de trabalhos futuros:

- ✓ Realizar o mapeamento bidimensional utilizando a técnica de μ XRF em fêmeas e machos para verificar se o comportamento observado na TXRF se mantém;
- ✓ Realizar o mapeamento bidimensional utilizando a μ XRF das regiões encefálicas compartimentadas: hipocampo, hipotálamo, córtex frontal e temporal, cerebelo e substância negra, para corroborar os resultados obtidos pela TXRF;

- ✓ Realizar um estudo variando a concentração de A β Os injetada nos animais, avaliando o déficit cognitivo através de estudos comportamentais e aplicando as técnicas de TXRF e μ XRF para avaliação da real influência da concentração dos A β Os na alteração da homeostase elementar no cérebro dos animais estudados; e
- ✓ Realizar o mapeamento tridimensional utilizando a micro tomografia computadorizada para avaliar a distribuição elementar em cérebros inteiros.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, K. M., HUNG, Y. H., DALZIEL, A. H., *et al.*, “Copper promotes the trafficking of the amyloid precursor protein.”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 10, pp. 8252-8262, 2011.
- AIGINGER, H. “Historical development and principles of total reflection X-ray fluorescence analysis (TXRF).”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 46, n. 10, pp. 1313-1321, 1991.
- ALZHEIMER’S ASSOCIATION, “2015 Alzheimer’s Disease Facts and Figures.”, *Alzheimer’s & Dementia*, v. 3 n. 11, pp. 1-83, 2015.
- ANDRÁSI, E., OROSZ, L., BEZUR, L., *et al.*, “Normal Human Brain Analysis.” *Microchemical Journal*, n. 51, v. 1-2, pp. 99-105, 1995.
- ANDRÁSI, E., PÁLI, N., MOLNÁR, Z. *et al.*, “Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients.”, *Journal of Alzheimer’s Disease*, v.7, n.4, pp. 273-284, 2005.
- ANDREINI, C. L., BANCI, L., BERTINI, I., *et al.*, “A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome.”, *Journal of Proteome Research*, v. 5, n. 1, pp. 196–201, 2006.
- ANGELI, S., BARTHYDT, T., JACOBS, R., *et al.*, “Manganese disturbs metal and protein homeostasis in *Caenorhabditis elegans*”, *Metallomics*, v. 6, n. 10, pp.1816- 1823, 2014.
- ANJOS, M. J., *Análise de Solos Agrícolas por Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2000
- ANSARI, M. A., SCHEFF, S. W., “Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex.”, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 69, n. 2, pp. 155-167, 2010.

ATWOOD, C. S, SCARPA, R. C., HUANG, X., *et al.*, “Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42.”, *Journal of Neurochemistry*, v. 75, n. 3, pp. 1219-1233, 2000.

AXELSEN, P. H., KOMATSU, H., AND MURRAY, I. V. J., “Oxidative Stress and Cell Membranes in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease.”, *Physiology (Bethesda)*, v. 26, n. 1, pp. 54-69, 2011.

AYTON S., LEI P., BUSH A. I., “Metallostasis in Alzheimer’s disease”, *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 62, 76-89.
b, n. 1, pp. 379, 2014.

BANERJEE, P., SAHOO, A., ANAND, S., *et al.*, “Multiple mechanisms of iron-induced amyloid beta-peptide accumulation in SHSY5Y cells: protective action of negletein.”, *Neuromolecular Medicine*, v. 16, n. 4, pp. 787-198, 2014

BARNHAM, K. J., CICCOTOSTO, G. D., TICKLER, A. K., *et al.*, “Neurotoxic, redox-competent Alzheimer's beta-amyloid is released from lipid membrane by methionine oxidation.”, *Journal of Biological Chemistry.*, v. 278, n. 44, pp. 42959-42965, 2003.

BARTZOKIS, G., SULTZER, D., CUMMINGS., J, *et al.*, “In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer disease using magnetic resonance imaging.”, *Archives of General Psychiatry*, v. 57, n. 1, pp. 47-53, 2000.

BASHEER, M. P., PRADEEP KUMAR, K. M., SREEKUMARAN, E., AMAKRISHNA T. “A study of serum magnesium, calcium and phosphorus level, and cognition in the elderly population of South India.” *Alexandria Journal of Medicine.*, v. 52, pp. 303–308, 2016.

BAYER, T. A., SCHAFER, S., BREYHAN, H., *et al.* “A Vicious Circle: Role of Oxidative Stress, Intraneuronal A β and Cu in Alzheimer’s Disease.”, *Clinical Neuropathology*, v. 25, n. 4, pp. 163–171, 2006.

BAYER, T. A., SCHAFER, S., SIMONS, A., et al. "Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Abeta production in APP23 transgenic mice.", *Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A*, v. 100, n. 24, pp. 14187-14192, 2003.

BEAR, M. F., BARRY, W., CONNORS, M. A., *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*, 4 ed., Porto Alegre, Artmed, 2017.

BECKHOFF, B., KANNIGIEBER, B., LANGHOFF N., et al., *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*, Berlin, Springer, 2006.

BELLINGHAM, S. A., LAHIRI, D. K., MALONEY, B., et al., "Copper depletion down-regulates expression of the Alzheimer's disease amyloid-beta precursor protein gene", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 19, pp. 20378-20386, 2004.

BENILOVA, I., KARRAN, E., De STROOPER, B., "The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes.", *Nature Neuroscience*, v. 15, n. 3, pp. 349-357, 2012.

BERG, D., YODIM, M. B., "Role of iron in neurodegenerative disorders.", *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, v. 17, n. 1, pp. 5-17, 2006.

BERNASCONI, G., "Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) Software, Package: Documentation Version 1.2.", *International Atomic Energy Agency*, Vienna, 1999.

BLOOM, G. S., "Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis.", *JAMA Neurology*, v. 71, n. 4, pp. 505-508, 2014.

BODOVITZ, S., FALDUTO, M. T., FRAIL, D. E., et al., "Iron levels modulate alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein.", *Journal of Neurochemistry*, v. 64, n. 1, pp. 307-315, 1995.

BOMFIM, T. R., FORNY-GERMANO, L., SATHLER, L. B., *et al.*, “An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated A β oligomers.”, *The Journal of Clinical Investigation*, v. 122, 1339-1353, 2012.

BREWER, G. J., “The risks of free copper in the body and the development of useful anticopper drugs,”, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 11, n. 6, pp. 727-732, 2008.

BRITO-MOREIRA, J., LOURENCO, M. V., OLIVEIRA, M. M., “Interaction of amyloid- β (A β) oligomers with neurexin 2 α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice.”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 5;292, n. 18, pp. 7327-7337, 2017.

BUSH A.I, “The metal theory of Alzheimer’s Disease”, *Journal of Alzheimer’s Disease*, v. 33, n. 1, pp. 277–281, 2013.

BUSH, A. I., “The metallobiology of Alzheimer’s disease.”, *Trends in Neurosciences*, v. 26, n. 4, pp. 207–214, 2003.

BUSH, A. I., PETTINGELL, W. H., MULTHAUP, G., *et al.*, “Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc.”, *Science*, v. 265, n. 5177, pp. 1464-1467, 1994a.

BUSH, A.I., PETTINGELL, W. H. JR., PARADIS, M. D., *et al.*, “Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc.”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 16, pp. 12152-12158, 1994b.

BUTTERFIELD, D. A., GALVAN, V., LANGE, M.B., *et al.*, “In Vivo Oxidative Stress in Brain Of Alzheimer Disease Transgenic Mice: Requirement For Methionine 35 in Amyloid β -Peptide Of APP”, *Free Radical Biology & Medicine.*, v. 48, n. 1 pp. 136-144, 2010.

BUTTERFIELD, D. A., REED, T., NEWMAN, S. F., *et al.*, “Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment”, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 43, n. 5, pp. 658–677, 2007.

BUTTERFIELD, D. A., SMOMLEY, A. M., SULTUNA, R., *et al.*, “Amyloid β -Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression.”, *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19, n. 8, pp. 823-835, 2013.

CANÇADO, F. A. X.; HORTA, M. L. *Envelhecimento cerebral*, In: FREITAS, E. V., PY, L., NERI, A. L., *et al.*, *Tratado de geriatria e gerontologia*, Guanabara Koogan, pp. 112-127, 2002

CANZONIERO, L. M., SNIDER, B. J., “Calcium in Alzheimer's disease pathogenesis: too much, too little or in the wrong place?”, *Journal of Alzheimer's Disease.*, v. 8, n. 2, 147-154, 2005.

CARVALHO FILHO, E. T. De; NETTO, P. M., *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica*, 1 ed., São Paulo, Atheneu, 1994.

CASS, W. A., GRONDIN, R., ANDERSEN, A. H., *et al.*, “Iron accumulation in the striatum predicts aging-related decline in motor function in rhesus monkeys.” *Neurobiology of Aging*, v. 28, n. 2, pp. 258-271, 2007.

CASTRO, A. R. B de., “Synchrotron Light and its Applications.” *Physicae 2*, [S.I.], pp. 31-41, 2001

CATER, M. A., MCINNES, K. T., LI, Q. X., *et al.*, “Intracellular copper deficiency increases amyloid-beta secretion by diverse mechanisms.”, *The Biochemical Journal*, v.412, n. 1, pp. 141-152, 2008.

CERPA, W. F., BARRIA, M. I., CHACON, M. A., *et al.*, “The N-terminal copper-binding domain of the amyloid precursor protein protects against Cu²⁺ neurotoxicity in vivo.”, *FASEB Journal*, v. 18, n. 14, pp. 1701-1703, 2004.

CHAUHAN, V., CHAUHAN, A., "Oxidative stress in Alzheimer's disease.", *Pathophysiology*, v. 13, n. 3, pp. 195-208, 2006.

CHEN S., LU F.F., SEEMAN P., *et al.*, “Quantitative proteomic analysis of human substantia nigra in Alzheimer’s disease, Huntington’s disease and multiple sclerosis.” *Neurochemical. Research.*, v.37, n. 12, pp. 2805–2813, 2012.

CHOI, D. W., AND KOH, J. Y., “Zinc and brain injury.”, *Annual Review of Neuroscience*, v. 21, pp. 347–375, 1998.

CHONG-BO, Z., YA-PING, P. XAO-HUA, *et al.*, “Delayed rectifier potassium currents and Kv2.1 mRNA increase in hippocampal neurons of scopolamine-induced memory-deficient rats.”, *Neuroscience Letters*, v. 373, n. 2, 99-104, 2004.

COLE, T. B., WENZEL, H. J., KAFER, *et al.*, “Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene.”, *Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A*, v. 96, n. 4, pp.1716–1721, 1999.

COLLINGWOOD, J. F., MIKHAYLOVA, A., DAVIDSON, M., *et al.*, “In situ characterization and mapping of iron compounds in Alzheimer’s disease tissue.”, *Journal of Alzheimer Disease*, v. 7, n. 4, pp. 267-272, 2005.

CONDE, J. R., STREIT, W. J., “Microglia in the aging brain”, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 65, n. 3, pp, 199-203, 2006.

CONNOR, J. R., SNYDER, B. S., BEARD, J. L., *et al.*, “Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer’s disease.”, *Journal of Neuroscience Research*, v. 31, n. 2, pp. 327-335, 1992.

CORRIGAN, F. M., REYNOLDS, G. P., WARD, N. I., “Hippocampal tin, aluminum and zinc in Alzheimer’s disease.”, *Biometals*, v. 6, n. 3, pp. 149–154, 1993.

COSTA, A. C. M., *Análise da Poluição Ambiental produzida por Metais pesados em Águas Superficiais da Baía de Sepetiba usando SRTXRF.*, Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.

CRICHTON, R. R., *Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences.*, 4 ed., Chichester, John Wiley & Sons, 2009.

CROUCH, P. J., HUNG, L. W., ADLARD, P. A., *et al.*, “Increasing Cu bioavailability inhibits A β oligomers and Tau phosphorylation.”, *Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.*, v. 106, n. 2, pp. 381-386, 2009.

CUAJUNGO, M. P., FAGÉT, K. Y., “Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease.”, *Brain Research Reviews*, v. 41, n. 1, pp. 44-56, 2003.

CUAJUNGO, M. P., GOLDSTEIN, L. E., NUNOMURA, A., *et al.*, “Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of Abeta by zinc.”, *The journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 26, pp. 19439–19442, 2000.

CUAJUNGO, M. P., LEES, G. J., “Zinc and Alzheimer's disease: is there a direct link?”, *Brain Research Reviews*, v. 23, n. 3, pp. 219-236, 1997.

DANSCHER, G., JENSEN, K. B., FREDERICKSON, C. J., *et al.*, “Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's diseased brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material.”, *Journal of Neuroscience Methods*, v. 76, n. 1, pp. 53–59, 1997.

De GODOY, M. A., SARAIVA, L. M., DE CARVALHO, L. R., *et a.*, “Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers.”, *Journal of Biological Chemistry.*, v. 9;293, n. 6, pp. 1957-1975, 2017.

DESHPANDE, A., KAWAI, H., METHERATE, R., *et al.*, “A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses,” *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 13, pp. 4004–4015, 2009.

DONG, J., ATWOOD, C. S., ANDERSON, V. E., *et al.*, “Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence.”, *Biochemistry*, v. 42, n. 10, pp. 2768–2773, 2003.

DURÁN-GONZÁLEZ, J., MICHI, E. D., ELORZA, B., *et al.*, “Amyloid β peptides modify the expression of antioxidant repair enzymes and a potassium channel in the septohippocampal system.”, *Neurobiology of Aging*, v. 34, n. 8, pp. 2071-2076, 2013.

EISBERG, R., RESNIK, R., *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*, 7 ed. Rio de Janeiro, Campus, 1988.

EKTESSABI A., YOSHIDA, S., TAKADA K., “Distribution of iron in a single neuron of patients with Parkinson’s disease”, *X-Ray Spectrometry*, v.28, n. 6, pp. 456-461, 1999.

ESKICI, G., AXELSEN, P. H., “Copper and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease.”, *Biochemistry*, v. 51, n. 32, pp. 6289-6311 2012.

FALLER, P., HUREAU, C., “Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid-beta peptide.”, *Dalton Transactions*, v. 21, n. 7, pp. 1080–1094, 2009.

FALLER. P., HUREAU. C., BERTHOUMIEU. O., “Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide.”, *Inorganic Chemistry*. v. 52, n. 21, pp. 12193-12206, 2013.

FANG, Y. Z., YANG, S., WU, G. “Free radicals, antioxidants, and nutrition.”, *Nutrition*, v. 18, pp. 872- 879, 2002.

FARRALL, A. J., WARDLAW, J. M., “Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease-systematic review and meta-analysis.’, *Neurobiology of Aging*, v. 30, n. 3, pp. 337-352, 2009.

FELICE, F. G., WU D., LAMBERT, M. P., FERNANDEZ, S. J., *et al.*, “Alzheimer’s disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers.” *Neurobiology of Aging*, v. 29, pp. 1334–1347, 2008.

FERREIRA, S. T., KLEIN, W. L., “The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer’s disease”, *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 96, n. 4, pp. 529-543, 2011.

FERREIRA, S. T., LOURENÇO, M. V., OLIVEIRA, M. M., *et al.*, “Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease.”, *Frontier in Cellular Neuroscience*, v. 9, n. 191, pp. 1-17. 2013.

FIGUEIREDO, C. P., BICCA, M. A., LATINI, A, *et al.*, “Folic acid plus α -tocopherol mitigates amyloid- β -induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity.”, *Journal of Alzheimer’s Disease*, v. 24, n. 1, pp; 61-75, 2011.

FIGUEIREDO, C. P., CLARKE, J. R., LEDO, J. H., *et al.*, “Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight a β oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers.”, *The Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 23, pp. 9626-9634, 2013.

FOSMIRE, G. J, “Zinc toxicity.”, *The American Journal of the Clinical Nutrition*, v. 51, n. 2, pp. 225-227, 1990.

FRAGA, C. G., “Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health.”, *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26, n. 4-5, pp. 235-244, 2005.

FREDERICKSON, C. J., HOWELL, G. A., HAIGH, M. D., *et al.*, “Zinc-containing fiber systems in the cochlear nuclei of the rat and mouse.”, *Hearing Research*, v. 36, n. 2-3, pp. 203–211, 1988.

FREDERICKSON, C. J., KOH, J. Y., BUSH, A. I. *et al.*, “The neurobiology of zinc in health and disease.”, *Nature Reviews: Neuroscience*, v. 6, n. 6, pp. 449–462 2005.

FREDERICKSON, C. J., SUH, S. W., SILVA, D., *et al.*, “Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron.”, *The Journal of Nutrition*, v. 130, pp. 1471S–1483S, 2000.

FREIDOVICH, I., “Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what’s the matter with oxygen?”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 893, pp.13 - 18.

GAGGELLI, E., KOZLOWSKI, H., VALENSIN, D., *et al.*, “Copper Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis).”, *Chemical Reviews*, v. 106, n. 6, pp. 1995–2044, 2006.

GANDY, S., “The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease.”, *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 5, pp. 1121-1129, 2005.

GARBELLINI, D., *Fisioterapia aplicada aos idosos portadores de disfunções neurológicas*, In: REBELATTO, J. R.; MORELLI, J. G. DA S., *Fisioterapia geriátrica: a prática da assistência ao idoso*, 2 ed, São Paulo: Manole, p. 237-242, 2007.

GARZON-RODRIGUEZ, W., YATSIMIRSKY, A. K., GLABE, C. G., “Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(II) ions to Alzheimer’s A beta peptide studied by fluorescence.”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 9, n. 15, pp. 2243-2248, 1999.

GIANNAKOPOULOS, P., HERRMANN, F. R., BUSSIÈRE, T., *et al.*, “Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease.” *Neurology*. v. 60, n. 9, pp. 1945-1500, 2003.

GILGUN-SHERKI, Y., MELAMED, E., OFFEN, D., “Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier.”, *Neuropharmacology*, v. 40, n. 8, pp. 959-975, 2001.

GOTZ, M. E., DOUBLE, K., GERLACH, M., *et al.*, “The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease.”, *Annals of the New York Academy of Science*, v. 1012, pp. 193-208, 2004.

GRAUERT, A., ENGEL, D. A., RUIZ, A. J., “Endogenous zinc depresses GABAergic transmission via T-type Ca²⁺ channels and broadens the time window for integration of glutamatergic inputs in dentate granule cells.”, *The Journal of Physiology*, v. 592, n. 1, pp. 67–86, 2013.

GRILLI, M., GOFFI, F., MEMO, M., *et al.*, “Interleukin-1 β and Glutamate Activate the NF- κ B/Rel Binding Site from the Regulatory Region of the Amyloid Precursor Protein Gene in Primary Neuronal Cultures.”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, pp. 15002–15007, 1996.

GU, L., LIU, C., GUO, Z., “Structural insights into A β 42 oligomers using site-directed spin labeling.”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 26, pp. 18673-18683, 2013.

HAMBIDGE, M., “Human zinc deficiency.”, *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 5S, pp. 1344S–1349S, 2000.

HANE, F., LEONENKO, Z., “Effect of metals on kinetic pathways of amyloid- β aggregation.”, *Biomolecules*, v. 4, pp. 101-116, 2014.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A.; “Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.”, *Science*, v. 256, n. 5054, pp. 184-185, 1992.

HARDY, J., SELKOE, D. J., “The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.”, *Science*, v. 297, n.5580, pp. 353-356, 2002.

HARMAN, D., “The aging process”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, v. 78, pp. 7124–7128, 1981.

HE, W., BARROW, C. J., “The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta.”, *Biochemistry*, v. 38, n. 33, pp. 10871-10877, 1999.

HENSLEY, K., CARNEY, J. M., MATTSON, M. P., *et al.*, “A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, v. 12;91, n. 8, pp. 3270-3274, 1994.

HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U., GALY, B., *et al.*, “Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism.”, *Cell*, v. 142, n. 1, pp. 24-38, 2010.

HERRUP, K., “The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis”, *Nature Neuroscience*, v. 18, n. 6, pp. 794-799, 2015.

HONDA, K., CASADESUS, G., PETERSEN, R. B., *et al.*, “Oxidative stress and redox-active iron in Alzheimer’s disease.”, *Annals of the New York Academy of Science*, v. 1012, pp. 179-182, 2004.

HOPT, A., KORTE, S., FINK, H., *et al.*, “Methods for studying synaptosomal copper release.”, *Journal of Neuroscience Methods*, v. 128, n. 1-2, pp. 159-172, 2003.

HOUSE, E., ESIRI, M., FORSTER, G., *et al.*, “Aluminium, iron and copper in human brain tissues donated to the Medical Research Council’s Cognitive Function and Ageing Study.”, *Metallomics*, v. 4, n. 1, pp. 56-65, 2012.

HOWELLS, C., SAAR, K., EATON, E., *et al.*, “Redox-active Cu(II)-A β causes substantial changes in axonal integrity in cultured cortical neurons in an oxidative-stress dependent manner.”, *Experimental Neurology*, v. 237, n. 2, pp. 499-506, 2012.

HUTCHINSON, R.W., COX, A. G. MCLEOD, C. W., *et al.*, “Imaging and spatial distribution of beta-amyloid peptide and metal ions in Alzheimer’s plaques by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry.”, *Analytical. Biochemistry*, v. 346, n. 2, pp. 225–233, 2005.

IDE-EKTESSABI, A., RABIONET, M., “The Role of Trace Metallic Elements in Neurodegenerative Disorders: Quantitative Analysis Using XRF and XANES Spectroscopy.”, *Analytical Sciences*, v. 21, n. 7, pp. 885-892, 2005.

INAN, S. Y., AKSU, F., BAYSAL, F., “The effects of some K(+) channel blockers on scopolamine- or electroconvulsive shock-induced amnesia in mice.”, *European Journal of Pharmacology*, v. 407, n. 1-2, pp. 159-164, 2000.

IZQUIERDO, I., *Memória*, 2 ed., Porto Alegre, Artmed, 2011.

JANSSENS, K., VITTIGLIO, G., DERAEDT, I., “Use of microscopic XRF for non destructive analysis in Art and Archeometry.”, *X-ray Spectrometry*, v.29, p. 73-91, 2000.

JOMOVA, K., VONDRAKOVA, D., LAWSON, M., *et al.*, “Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders.”, *Molecular and Cell Biochemistry*, v. 345, n. 1-2, pp. 91–104, 2010.

KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M., *Fundamentos da Neurociência e Comportamento*, 5 ed., Rio de Janeiro, Artmed, 2014.

KANUMAKALA, S., BONEH, A., ZACHARIN, M., “Pamidronate treatment improves bone mineral density in children with Menkes disease.”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 25, n. 5, pp. 391-398, 2002.

KAYED, R., SOKOLOV, Y., EDMONDS, B., *et al.*, “Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases.”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 45, pp. 46363-46366, 2004.

KENDEL, E. R., SCHARTZ, J. M., JEWEL, T. M. *et al.*, *Princípios de Neurociências*, 5ª ed., Mc Graw Hill, São Paulo, 2014.

KENNARD, M. L., FELDMAN, H., YAMADA, T., *et al.*, “Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer’s disease.”, *Nature Medicine*, v. 2, n. 11, pp. 1230-1235, 1996.

KEPP K. P., “Alzheimer’s disease: How metal ions define β -amyloid function”, *Coordination Chemical Reviews*, v. 351, pp. 127-159, 2017.

KILLILEA, D. W., WONG, S. L., CAHAYA, H. S., *et al.*, “Iron accumulation during cellular senescence.”, *Annals of the New York Academy of Science*, v. 1019, pp. 365-367, 2004.

KIM, D. K., SEO, M. Y., LIM, S. W., *et al.* “Serum melanotransferrin, p97 as a biochemical marker of Alzheimer’s disease.”, *Neuropsychopharmacology*, v. 25, n. 1, pp. 84-90, 2001.

KLEIN, W. L., KRAFFT, G. A., FINCH, C. E., “Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?”, *Trends in Neuroscience*, v. 24, n. 4, pp. 219-224, 2001.

KLEIN, W.L. “Cytotoxic intermediates in the fibrillation pathway ($A\beta$ oligomers in Alzheimer’s disease as a case study)”. In: *Proteins Reviews*, v. 4, *Protein misfolding, aggregation, and conformational diseases*, Springer, pp. 60-81, 2006.

KLOCKENKAMPER, R., VON BOHLEN., A., *Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods*, 2nded., Wiley, New York, 2015.

KONG, G. K., MILES, L. A., CRESPI, G. A., *et al.*, “Copper binding to the Alzheimer's disease amyloid precursor protein.”, *European Biophysics Journal*, v. 37, n. 3, pp. 269-279, 2008.

KOZLOWISK, H., JANCKA-KLOBS, A., BRASUN, J., *et al.*, “Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation).”, *Coordination Chemistry Reviews*, v. 253, n. 21-22, pp. 2665-2685, 2009.

KOZLOWSKI H., LUCZKOWSKI M., REMELLI M., *et al.*, “Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer’s, Parkinson’s and prion diseases)”, *Coordination Chemistry Reviews*, v. 256, n. 19-20, pp. 2129–2141, 2012.

KREBS, N., LANGKAMMER, C., GOESSLER, W., *et al.*, “Assessment of trace elements in human brain using inductively coupled plasma mass spectrometry.”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 28, n. 1, pp. 1-7, 2014.

KREUTZ, F., *Efeito do peptídeo Beta-Amilóide sobre a biossíntese de gangliosídeos e avaliação da atividade neuroprotetora do GMI*, Dissertação de Msc, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2010.

KRUSZEWSKI M., “Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress.”, *Mutation Research*, v. 53, n. 1-2, pp. 81-92, 2003.

La FERLA, F. M., GREEN, K. N., ODDO, S., “Intracellular amyloid- β in Alzheimer’s disease.”, *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 7, pp. 499-509, 2007.

La MONTE, de S. M., “Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer’s disease: mini-review.” *European Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 1, pp. 1954–1960, 2014.

LACHANCE, G. R.; CLAISSE, F. *Quantitative X-ray Fluorescence analysis: Theory and Application*, 1 ed., New York: John Willey & Sons, 1995.

LACOR, P. N., BUNIEL, M. C., CHANG, L., *et al.*, “Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers.”, *The Journal of Neuroscience*. V. 24, pp. 10191–10200, 2004.

LANKOSZ, M., SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., CHWIEJ, J., *et al.*, “Research in quantitative microscopic X-ray fluorescence analysis.”, *Spectrochimica Acta Part B*. v. 59, n. 10-11, pp. 1517-1521 2004.

LEDO, J. H.; AZEVEDO, E. P.; CLARKE, J. H.; *et al.*, “Amyloid- β oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice.”, *Molecular Psychiatry*, v. 18, n. 10, pp. 1053–1054, 2013.

LEE, J. Y., COLE, T. B., PALMITER, R. D., *et al.*, “Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice.” *Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.*, v. 99, n. 11, pp. 7705–7710, 2002.

LEE, J., KIM, C. H., KIM, D. G., *et al.*, “Zinc Inhibits Amyloid β Production from Alzheimer's Amyloid Precursor Protein in SH-SY5Y Cells.”, *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, v. 13, n. 3, pp. 195–200. 2009.

LELIE, H. L., LIBA, A., BOURASSA, M. W., *et al.*, “Copper and zinc metallation status of copper-zinc superoxide dismutase from amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice.”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 4, pp. 2795–2806, 2011.

LEMERE, C. A., MASLIAH, E., “Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy?”, *Nature Reviews Neurology*, v.6, n. 2, pp. 108–119, 2010.

LENT, R., *Cem Bihões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência*, 2 ed., São Paulo, Atheneu, 2010.

LESKOVJAN, A. C., KRETLOW, A., LANZIROTTI, A., *et al.*, “Increased brain iron coincides with early plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease.”, *Neuroimage*, v. 55, n. 1, pp. 32-38, 2011.

LI, G. J., ZHENG, W., “Regulation of neuroactive metals by the choroid plexus,” In Zheng, W., Chodobski, A., *The Blood-Cerebrospinal Barrier*, cap. 9, New York, Taylor & Francis, 2005.

LI, T., XIE, Y., BOWE, B., *et al.*, “Serum phosphorus levels and risk of incident dementia.”, *PLoS ONE*, v. 12, pp. 1-19, 2017.

LING, Y., MORGAN, K., KALSHEKER, N. “Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease.”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biololgy*, v. 35, n. 11, pp. 1505–1535, 2003.

LIPPARD, V. S. J., BERG, J. M., 1994, *Bioorganische Chemie Spektrum Akademischer Verlag*, Springer, Heidelberg.

LIU, G., MEN, P., KUDO, W., *et al.*, “Nanoparticle-chelator conjugates as inhibitors of amyloid- β aggregation and neurotoxicity: A novel therapeutic approach for Alzheimer Disease.”, *Neuroscience Letters*, v. 455, n. 3, pp 187-190, 2009.

LOEFFLER, D. A., LEWITT, P. A., JUNEAU, P. L., *et al.*, “Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders.”, *Brain Research*, v. 738, n. 2, pp. 265-274, 1996.

LOPES, R. T., LIMA, I., PEREIRA, G. R., *et al.*, “Synchrotron radiation X-ray microfluorescence techniques and biological applications.” *Pramana – Journal of Physics*, v. 76, n. 2, pp. 271-279, 2011.

LOURENCO, M. V., CLARKE, J.R., FROZZA. R. L., *et al.*, “TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's β -amyloid oligomers in mice and monkeys.” *Cell Metabolism*, v. 18, n. 6, pp. 831-843, 2013.

LOURENCO, M. V., FERREIRA, S. T., De FELICE, F. G., “Neuronal stress signaling and eIF2 α phosphorylation as molecular links between Alzheimer's disease and diabetes.”, *Progress in Neurobiology*, v. 129, pp. 37-57, 2015.

LOVELL, M. A., ROBERTSON, J. D., TEESDALE, W. J., “Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques.”, *Journal of the Neurological Sciences*, v. 158, n. 1, pp. 47-52, 1998.

MACHADO, A., HAERTEL, L. M., *Neuroanatomia Funcional*, 3 ed., Rio de Janeiro, Atheneu, 3 ed., 2013.

MACREADIE, I. G., “Copper transport and Alzheimer's disease.”, *European Biophysics Journal*, v. 37, n. 3, pp. 295- 300, 2008.

MAGAKI, S., RAGHAVAN, R., MUELLER, C., *et al.*, “Iron, copper, and iron regulatory protein 2 in Alzheimer's disease and related dementias.”, *Neuroscience Letters*, v. 418, n. 1, pp. 72-76, 2007.

MANTYH, P. W., GHILARDI, J. R., ROGERS, S., *et al.*, “Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide.”, *Journal of Neurochemistry*, v. 61, n. 3, pp. 1171-1174, 1993.

MARCUS, D. L., THOMAS, C., RODRIGUEZ, C., *et al.*, “Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease.”, *Experimental Neurology*, v. 150, n. 1, pp. 40-44, 1998.

MOSCONI, L., BERTI, V., GUYARA-QUINN, C., *et al.* “Perimenopause and emergence of an Alzheimer’s bioenergetic phenotype in brain and periphery.”, *PLoS ONE*, v. 12, n. 10, pp. 1-16, 2017.

MATÉS, J. M., SEGURA, J. A., ALONSO, F. J., *et al.*, “Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms.”, *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, n. 9, pp. 1328-1341, 2010.

MATTSON, M. P. “Roles of the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal in Obesity, the Metabolic Syndrome, and Associated Vascular and Neurodegenerative Disorders.”, *Experimental Gerontology*, v. 44, n. 10, pp. 625-633, 2009.

MATTSON, M. P., “Calcium and neurodegeneration.”, *Aging Cell.*, v. 6, n. 3, pp. 337-350, 2007.

MATTSON, M. P., “Pathways towards and away from Alzheimer’s disease.”, *Nature*, v. 430, n. 7000, pp. 631-639, 2004.

MATTSON, M.P., CHAN, S. L., “Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer’s disease.”, *Cell Calcium*, v.34, n.4, pp. 385-397, 2003.

MAURER, I., ZIERZ, S., MOLLER, H. J., “A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients.”, *Neurobiology of Aging*, v. 21, n. 3, pp. 455-462, 2000.

MAVROUDIS, I. A., FOTIOU, D. F., ADIPEPE, L. F., *et al.*, “Morphological changes of the human purkinje cells and deposition of neuritic plaques and neurofibrillary tangles on the cerebellar cortex of Alzheimer's disease.”, *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, v. 25, n. 7, pp. 585-591, 2010.

MAYES, J., TINKER-MILL, C., KOLOSOV, O., *et al.*, “ β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease are not inert when bound to copper ions but can degrade hydrogen peroxide and generate reactive oxygen species.”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 17, pp. 12052– 12062, 2014.

MAYNARD, C. J., CAPPAL, R., VOLITAKIS, I., *et al.*, “Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron.”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 47, pp., 44670-44676, 2002.

MILLER, L., M., WANG, Q., TELIVALA, T. P., *et al.*, “Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease.”, *Journal of Structural Biology*, v. 155, n. 30–37, 2006.

MIZUNO, D., KAWAHARA, M., “The molecular mechanisms of zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular type senile dementia.”, *International Journal of Molecular Science*, v. 14, n. 11, pp. 22067-22081, 2013.

MUNDY, W. R., FREUDENRICH, T. M., “Sensitivity of immature neurons in culture to metal-induced changes in reactive oxygen species and intracellular free calcium.” *Neurotoxicology*, v. 21, n. 6, pp. 1135-1144, 2000.

NALIVAEVA, N. N., TURNER, A. J., “The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease.”, *FEBS Letters*, v. 587, n. 13, pp., 2046-2054, 2013.

NASCIMENTO FILHO, V.F. *Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF)*., Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba., pp.1-32, 1999.

NUTTALL, R. J., OTEIZA, P. I., “Zinc and the aging brain”, *Genes & Nutrition*, v. 9, n. 1, pp. 379, 2014.

OPAZO C., HUANG X., CHERNY R. A, *et al.*, “Metalloenzyme-like activity of Alzheimer’s Disease β -Amyloid Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H_2O_2 ”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 43, pp. 40302–40308, 2002.

PAN, Y., XU, X., TONG, X., *et al.*, “Messenger RNA and protein expression analysis of voltage-gated potassium channels in the brain of $A\beta_{25-35}$ -treated rats”, *Journal of Neuroscience Research*, v. 77, n. 1, pp. 94-99, 2004.

PANAYI, A. E., SPYROU, N. M., IVERSEN, B. S., *et al.*, “Determination of cadmium and zinc in Alzheimer’s brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry.”, *The Journal of the Neurological Science*, v. 195, n. 1, pp. 1-10, 2002.

PAOLETTI, P., VERGNANO, A. M., BARBOUR, B., *et al.*, “Zinc at glutamatergic synapses.”, *Neuroscience*, v. 158, n. 1, pp. 126–136, 2009.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Compact*, 6^o Ed, Academic Press, San Diego, 2007.

PIMPLIKAR, S.W., “Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer’s disease.”, *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, V. 41, n. 6, pp. 1261-1268, 2009.

PITHADIA, A. S., LIM, M. H., “Metal-associated amyloid-beta species in Alzheimer’s disease.”, *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 16, n. 1-2, pp. 67–73, 2012.

PITTELA, J. E. H., *Envelhecimento Cerebral normal: Morfologia*, In: CANÇADO, F. A. X., *Noções práticas de geriatria*, Coopmed, Belo Horizonte, pp. 69-81, 1994.

PRANGE, A.; SCHWENKE, H. “Trace element analysis using total reflection X-ray fluorescence spectrometry.”, *Advances in X-Ray Analysis*, v. 35, pp. 899-923, 1992.

PUZZO, D., VITOLO, O., TRINCHESE, F., *et al.*, “Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity.”, *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 29, 6887-6897, 2005.

QUINTANA, C., BELLEFQIH, S., LAVAL, J. Y., *et al.*, “Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer’s disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level.”, *Journal of Structural Biology*, v. 153, n. 1, pp. 42-54, 2006.

RAJAN, M. T., JAGANNATHA RAO, K. S., MAMATHA, B. M., *et al.*, “Quantification of trace elements in normal human brain by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.”, *Journal of Neurological Sciences*, v. 146, n. 2, pp. 153-166, 1997.

RAMOS, P., SANTOS, A., PINTO, N. R., “Iron levels in the human brain: a post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes.”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 28, n. 1, pp. 13-17, 2014.

RELIGA, D., STROZYK, D., CHERNY, R. A., *et al.*, “Elevated cortical zinc in Alzheimer disease.”, *Neurology*, v.67, n.1, pp. 69–75, 2006.

RIBEIRO, A. M., *Envelhecimento Cerebral normal: Bioquímica*, In: CANÇADO, F. A. X., *Noções práticas de geriatria*, Belo Horizonte, Coopmed, p. 61-67, 1994.

ROBERTS, B. R., RYAN, T. M., BUSH, A. I., *et al.*, “The role of metallobiology and amyloid- β peptides in Alzheimer’s disease.”, *Journal of Neurochemistry*, v. 120, n. 1, pp. 149-166, 2012.

ROGERS, J. T., RANDAL, J. D., CAHIL, C. M., *et al.*, “An iron-responsive element type II in the 5-untranslated region of the Alzheimer’s amyloid precursor protein transcript.”, *The journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 47, pp. 45518-45528, 2002.

ROTTKAMP, C. A., RAINA, A. K., ZHU X., *et al.*, “Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity.”, *Free Radical Biology & Medicine*, v. 15, n. 4, pp. 447-450, 2001.

RUIZ, F. H., GONZALEZ, M., BODINI, M., *et al.*, “Cysteine 144 is a key residue in the copper reduction by the β -amyloid precursor protein.”, *Journal of Neurochemistry*, v. 73, n. 3, pp. 1288-1292, 1999.

SAKONO, M., ZAKO, T., “Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers.”, *The FEBS Journal*, v. 277, n. 6, pp. 1348-1358, 2010.

SALGANIK, R. I., “The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population.”, *Journal of the American College of Nutrition*, v. 20 n. 5, pp. 464S-472S, 2001.

SAMPIETRO, M., CAPUTO, L., CASATTA, A., *et al.*, “The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer’s disease.”, *Neurobiology Aging*, v. 22, n. 4, pp. 563-568, 2001.

SAMUDRALWAR, D. L., DIPRETE, C. C., NI, B. F., *et al.*, “Elemental imbalances in the olfactory pathway in Alzheimer's disease.”, *Journal of the Neurological Sciences*, v. 130, n. 2, pp. 139–145, 1995.

SARAIVA, L. M., SEIXAS DA SILVA, G. S., GALINA, A., *et al.*, “Amyloid- β triggers the release of neuronal hexokinase 1 from mitochondria.”, *PLoS One.*, v. 16;5, n. 12, pp. 2010.

SAYRE, L. M., PERRY, G., HARRIS, P. L., *et al.*, “In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer’s disease: a central role for bound transition metals.”, *Journal of Neurochemistry*, v. 74, n. 1, pp. 270-279, 2000.

SAYRE, L. M., PERRY, G., SMITH, M. A., “Oxidative Stress and Neurotoxicity”, *Chemical Research in Toxicology*, v.21, n. 1, pp. 172–188, 2008.

SAYRE, L. M., ZELASKO, D. A., HARRIS, P. L., *et al.*, “4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer’s disease.”, *Journal of Neurochemistry*, v. 68, n. 5, pp. 2092-2097, 1997.

SCHLIEF, M. L., WEST, T., CRAIG, A. M., *et al.*, “Role of the Menkes copper-transporting ATPase in NMDA receptor-mediated neuronal toxicity.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 103, n. 40, pp. 14919-14924, 2006.

SCHWENKE, H.; KNOTH, J. “A highly sensitive energy-dispersive X-ray spectrometer with multiple total reflection of the exciting beam.”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. 193, n.1, pp.239-243, 1982.

SEKLER, I., MORAN, A., HERSHFINKEL, M., *et al.*, “Distribution of the zinc transporter ZnT-1 in comparison with cheatable zinc in the mouse brain.”, *The Journal of Comparative Neurology*, v. 447, n. 3, pp. 201–209, 2002.

SENSI, S. L., PAOLETTI, P., KOH, J. Y., *et al.*, “The neurophysiology and pathology of brain zinc.”, *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 45, pp. 16076–16085, 2011.

SENSI, S. L., YIN, H. Z. WEISS, J. H., “AMPA/kainite receptor-triggered Zn²⁺ entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn²⁺ uptake and persistent mitochondrial dysfunction.”, *The European Journal of Neuroscience*, v. 12, n. 10, pp. 3813–3818, 2000.

SEO, Y. A., LI, Y., WESSLING-RESNICK, M., “Iron depletion increases manganese uptake and potentiates apoptosis through ER stress”, *Neurotoxicology*, v. 38, pp.67-73, 2013.

SILVERTHORN, D. U., *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*, 5 ed., Porto Alegre, Artmed, 2010.

SIMABUCO, S. M. *Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF). Descrição da Produção Científica, Faculdade de Engenharia Civil, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 2000.*

SMART, T. G., HOSIE, A. M., MILLER, P. S., “Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity.”, *Neuroscientist*, v. 10, n. 5, pp. 432–442, 2004.

SMITH, M. A. HARRIS, P. L. R., SAYRE., L. M. *et al.*, “Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, v. 94, n. 18, pp. 9866–9868, 1997.

SMITH, M. A., WEHR, K., HARRIS, P. L., *et al.* “Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer’s disease.”, *Brain Research*, v. 188, n. 788, pp. 232-236, 1998.

SOLÉ, V. A., PAPILLON, E., COTTEM., *et al.*, “A multiplatform code for the analysis of energy dispersive X-ray fluorescence spectra”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 62. n. 1, pp. 63-68, 2007.

TABATON, M., NUNZI, M. G., XUE, R., *et al.*, “Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid.”, *Biochemical and Biophysical Research. Communications*, v. 200, n. 3, pp. 1598-1603, 1994.

TAKASHIMA, A., HONDA, T., YASUTAKE, K., *et al.*, “Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons.”, *Neuroscience Research*, v. 31, n. 4, pp. 317-323, 1998.

TAKEDA E., YAMAMOTO H., YAMANAKA-OKUMURA H., *et al.*, “Dietary phosphorus in bone health and quality of life.”, *Nutrition Reviews.*, v. 70, n. 6, pp. 311-321, 2012.

THOMPSON, C. M., MARKESBERY, W. R., EHMANN, W. D., *et al.*, “Regional brain trace-element studies in Alzheimer’s disease.”, *Neurotoxicology*, v. 9, n. 1, pp. 1–7, 1988.

TIAN, Y., YANG, Z., ZHANG, T., “Zinc ion as modulator effects on excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons in Wistar rats,” *Neuroscience Research*, v. 68, n. 3, pp. 167–175, 2010.

TÕUGU, V., TIIMAN, A. AND PALUMAA, P., “Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity.”, *Metallomics*, v. 3, n. 3, pp. 250-261, 2011.

United States Census Bureau. *Mid-year population by older age groups and sex — world*. US Department of Commerce <<https://www.census.gov/topics/population.html>> Acesso em 23 jan 2018, as 10:00:30.

UTTARA, B., SINGH, A. V., ZAMBONI. P., *et al.*, “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options.”, *Mahajan, Current Neuropharmacology*, v. 7, n. 1, pp. 65-74, 2009.

VALLEE, B. L, FALCHUK, K. H., “The biochemical basis of zinc physiology.”, *Physiological Reviews*, v. 73, n. 1, pp. 79–118, 1993.

VAN GRIEKEN, R., MARKOWICZ A., 2002, *Handbook of X-ray Spectrometry*, 2 Ed. New York, Basel.

VILES, J. H., “Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases.”, *Coordinations Chemical Reviews*, v. 256, n. 19-20, pp. 2271–2284, 2012.

WANG, J., PANTOPOULOS, K., “Regulation of cellular iron metabolism.”, *The Biochemical Journal*, v. 434, n. 3, pp. 365–381 2011.

WASIAK, T., IONOV, M., NIEZNANSKI, K., *et al.*, "Phosphorus dendrimers affect Alzheimer's (Ab1–28) peptide and MAP-Tau protein aggregation." *Mol. Pharm.*, v. 9, pp. 458–469, 2012.

WATT, N. T., Whitehouse, I. J., Hooper, N. M., “The role of zinc in Alzheimer's disease.”, *International Journal of Alzheimer's Disease.*, v. 20, n. 9, pp. 1-10, 2011.

WEISS, J. H., SENSI, S. L., KOH, J. Y., “Zn(2+): a novel ionic mediator of neural injury in brain disease.”, *Trends in Pharmacological Science*, v. 21, n. 10, pp. 395–401, 2000.

WHITE, A. R., MULTHAUP, G., GALATIS, D., *et al.*, “Contrasting, species-dependent modulation of copper-mediated neurotoxicity by the Alzheimer's disease amyloid precursor protein.”, *The Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 2, pp. 365-376, 2002.

WHITE, A. R., REYES, R., MERCER, J. F., *et al.*, “Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice.”, *Brain Research*, v. 842, n. 2, pp. 439-444, 1999.

WILLIAMS, R., BUCHHEIT, C. L., BERMAN, N. E., *et al.*, “Pathogenic implications of iron accumulation in multiple sclerosis.”, *Journal of Neurochemistry*, v. 120, n. 1, pp. 7-25, 2012.

WILQUET, V., DE STROOPER, B., “Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration.”, *Current Opinion in Neurobiology*, v. 14 n. 4, pp. 582-588, 2004.

WRIGHT, R. O., BACCARELLI, A, “Metals and neurotoxicology.”, *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 12, pp. 2809-28013, 2007.

XU J, JIA Z, KNUTSON MD, *et al.*, “Impaired iron status in aging research.” *International Journal of Molecular Science*, v. 13, n. 2, pp. 2368-2386, 2012.

YANG, D. S., MCLAURIN, J., QIN, K., *et al.*, “Examining the zinc binding site of the amyloid- β peptide,”, *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 22, pp. 6692-6698, 2000.

YUMOTO, S., KAKIMI, S, OHSAKI, A., ISHIKAWA, A., “Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease.”, *Journal of Inorganic Biochemistry.*, v. 103, n. 11, pp. 1579-1584, 2009.

ZAINCHICK, V., ZAICHICK, S., “Trace Element Contents in Adenocarcinoma of the Human Prostate Gland Investigated by Neutron Activation Analysis”, *Cancer Research and Oncology*, v. 1 n. 1, pp. 1-10, 2016.

ZATTA, P., DRAGO, D., BOLOGNIN, S., *et al.*, “Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy.”, *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 30, n.7, pp.346-355, 2009.

ZAWIA, N., H., LAHIRI, D. K., CARDOZO-PELAEZ, “Epigenetics, oxidative stress and Alzheimer disease.”, *Free Radical Biology & Medicine*, v. 46, n. 9, pp. 346-348, 2009.

ZECCA, L., SHIMA, T., STROPPOLO, A., *et al.*, “Interaction of Neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain.”, *Neuroscience*, v. 73, n. 2, pp. 407-4015, 1996.

ZECCA, L., GALLORINI, M., SCHUNEMANN, V., *et al.*, “Iron, Neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes.”, *The Journal of Neurochemistry*, v. 76, n. 6, pp. 1766–1773, 2001.

ZECCA, L., STROPPOLO, A., GATTI, A., *et al.*, “The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 101, n. 26, pp. 9843-9848, 2004.

ZECCA, L., TAMPELLINI, D., RIZZIO, E., *et al.*, “The determination of iron and other metals by INAA in cortex, cerebellum and putamen of human brain and in their neuromelanins.”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 248, n. 1, pp. 129-131, 2001.

ZHANG, J., CAO, R., CAI, T *et al.*, “The role of autophagy dysregulation in manganese-induced dopaminergic neurodegeneration”, *Neurotoxicity Research*, v. 24, n. 4, pp. 4478-490, 2013.

ZHENG, W. H., BASTIANETTO, S., MENNICKEN, F., MA, W., KAR, S., “Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures.”, *Neuroscience.*, v. 115, n. 1, pp. 201-211, 2002.

ZHENG, W., MONNOT, A. D., “Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases.”, *Pharmacology & Therapeutics*, v. 133, n. 2, pp. 177–188, 2011.

ZLOKOVIC, B. V., “The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders.”, *Neuron.*, v. 57, n. 2, pp. 178-201, 2008.

ANEXO A

Tabelas das Concentrações Elementares Obtidas por TXRF

Tabela A.1 – Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) córtex frontal, córtex temporal e hipocampo dos grupos de camundongos suíços fêmeas do modelo

El.	Cortex Frontal			Temporal Córtex			Hipocampo		
	Controle	AD10	AD100	Controle	AD10	AD100	Controle	AD10	AD100
P	9865±732	14484±564*	15166±584**	8937±721	11285±803	12002±1036**	11461±743	15328±945*	16629±1092**
S	6589±438	9385±393*	10199±394**	5609±393	6826±587	7177±486	7525±397	10139±647*	10514±481**
K	19978±1797	27418±1760*	29776±2668**	15667±867	22180±2202	23075±2538**	21062±1059	29471±2038*	30876±2265**
Fe	76±11	141±29	124±23	59±3	166±45*	103±16	65±4	121±13*	72±11
Cu	16±2	21±1	27±6	12.4±0.3	29±6*	21±3	18±2	33±5*	19±3
Zn	80±7	113±13	210±64**	60±5	91±12	109±17**	107±10	146±17	117±13
Rb	26±2	35±2*	33±3	23±1	31±2*	29±2**	29±1	35±2*	31±2

experimental da Doença de Alzheimer

Valores representam média ± desvio padrão
Teste Dunnett

*diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

**diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o DA100 e o grupo controle

Tabela A.2 – Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) hipotálamo, cerebelo e substância negra dos grupos de camundongos suíços fêmeas do modelo experimental da Doença de Alzheimer

El.	Hipotálamo			Cerebelo			Substância Negra		
	Controle	AD10	AD100	Controle	AD10	AD100	Controle	AD10	AD100
P	15425±193	18104±972	18849±928**	10226±654	12175±1035	11215±567	12441±167	12861±850	16687±356**
S	8010±175	9712±615*	9670±452**	4890±241	6005±483	5467±266	5979±46	6140±325	7781±90**
K	24184±814	34998±3092*	32902±2096**	15986±1055	19470±2151	17960±1051	16205±227	22223±1176*	21441±518**
Fe	67±6	221±51*	106±22	51±2	74±6	77±12	98.0±0.4	131±7*	166±4**
Cu	29±4	45±8	35±10	19±2	23±3	20±3	11±1	37±5*	19±1
Zn	62±10	121±27	201±57**	65±7	77±7	65±7	128±4	170±10*	64±3**
Rb	27±2	35±1*	30±12	22±1	26±3	24±1	24±1	27±2	31±2

Valores representam média ± desvio padrão
Teste Dunnett

*diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

**diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o DA100 e o grupo controle

Tabela A.3 – Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) córtex frontal, córtex temporal e hipocampo dos grupos de camundongos suíços machos do modelo experimental da Doença de Alzheimer

El.	Córtex Frontal			Córtex Temporal			Hipocampo		
	Controle	AD10	AD100	Controle	AD10	AD100	Controle	AD10	AD100
P	13972±1152	13189±886	10604±418**	13860±692	14781±1023	11679±948	14972±592	11186±1084*	9814±777**
S	10171±746	9744±833	8598±539	9143±399	10765±753	8477±567	9822±307	7639±730*	6814±523**
K	25531±2206	28531±3122	21333±892	22511±1316	30583±2553*	22154±1094	23682±754	19186±1332*	16637±1434**
Fe	188±63	96±18	125±17	101±7	87±9	123±21	102±17	74±6	97±16
Cu	32±7	33±10	17±3	16±1	19±3	19±3	20±2	22±2	22±3
Zn	138±22	97±29	301±64**	127±14	92±18	210±47	82±5	83±4	169±30**
Rb	28±4	29±2	25±3	31±1	26±2	24±2**	30±1	30±1	25±2**

Valores representam média \pm desvio padrão

Teste Dunnett

*diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

**diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o DA100 e o grupo controle

Tabela A.4 – Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) hipotálamo, cerebelo e substância negra dos grupos de camundongos suíços machos do modelo experimental da Doença de Alzheimer

El.	Hipotálamo			Control	Cerebelo		Control	Substância Negra	
	Controle	AD10	AD100		AD10	AD100		AD10	AD100
P	16330±1393	17910±1321	11701±1320**	12938±990	12566±575	11391±1082	17712±448	11065±81*	15510±1628
S	10043±973	10749±1289	8646±810	6668±492	6337±273	6013±327	8988±300	5569±32*	7598±865
K	28133±2654	28337±3335	21791±2017	18771±918	15486±406*	15069±435**	22927±1399	15043±264*	16732±1395**
Fe	164±60	78±14	100±19	89±9	77±4	99±9	95±3	82±2*	213±64**
Cu	18±1	31±4	30±5	23±3	24±1	26±3	21±5	10±1	16±1
Zn	63±17	78±23	128±25	73±4	69±7	108±27	126±36	40±1	75±12
Rb	26±3	31±3	27±3	27±1	21±1*	20±1**	36±3	25.1±0.3*	16±2**

Valores representam média \pm desvio padrão

Teste Dunnett

*diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o DA10 e o grupo controle.

**diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o DA100 e o grupo controle

Multielement concentration analysis of Swiss mice brains on experimental model of Alzheimer's disease induced by β -amyloid oligomers

D.S. Almeida,^a R.S. Santos,^b M.J. Anjos,^b S.T. Ferreira,^{c,d} A.S. Souza^{c,d,*} and R.T. Lopes^{a,*} 

Alzheimer's disease (AD) is an insidious, progressive, and irreversible brain disorder that leads to memory loss and severe cognitive decline. However, the discovery that soluble β -amyloid oligomers are potent central nervous system neurotoxins has led to a new view of AD pathogenesis. Metals, such as zinc, iron, and copper, are all increased in the aged brain, and the contents of those metals in the brain of AD patients are higher than non-AD people. So, altered homeostasis of metal may result in the development of AD. Total reflection X-ray fluorescence analysis (TXRF) is a multielement analytical technique, which can be used for elemental trace analysis. In this work, TXRF was used to evaluate the elemental concentration and distribution on mice brain regions. Three groups were studied: control, AD10, and AD100, being the two latter were given a single intracerebroventricular injection of 10 pmol and 100 pmol (β -amyloid oligomers), respectively, to induce experimental AD. All samples were submitted to acid digestion. The TXRF measurements were performed at the X-Ray Fluorescence Beamline at Brazilian National Synchrotron Light Laboratory, using a monochromatic beam (11.5 keV) for the excitation. It was possible to determine the concentrations of the following elements: P, S, K, Fe, Cu, and Zn. Results showed differences in the elemental concentration in some brain regions between the AD groups and the control group. Furthermore, the difference in the hypothalamus in AD10 groups, both female and male, suggests an association between AD and changes in these elements. Copyright © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive dementia that, in early stages, manifests as a profound inability to form new memories. Its incidence is highest in people aged over 65 years.^[1] The basis for this specificity is unknown, but some evidences point to the involvement of neurotoxins derived from the self-associating β -amyloid (A β). A β generates the fibrils of the hallmark amyloid plaques of AD. Its production is elevated by disease-associated mutations and risks factors.^[2] Besides that, the pathological features of AD include: intracellular neurofibrillary tangles, loss of neurons and synapses, and activation of glial cells. However, the 'fibril hypothesis' fails to explain crucial clinical and pathological aspects of several degenerative diseases in AD, it has been pointed out that there is poor, or even the absence of correlation between plaque burden and dementia.^[3] The buildup of soluble β -amyloid oligomers (A β os) in the affected brains has been recognized as an additional neuropathological hallmark of AD. Early evidences indicate elevated levels of soluble A β and the presence of pre-fibrillar A β assemblies in AD affected brains.^[4] The large increase in soluble oligomers appears to be specific of brain regions responsible for cognitive functions that are impaired in AD patients.^[5] Studies have shown that A β os have been proposed to be major players in synapse failure in AD. The synapse failure is closely linked to memory loss.^[6]

Recently, it has been demonstrated that a single i.c.v. injection of A β os leads to memory deficits and depression.^[7,8] The mechanisms identified were neuroinflammation (elevated brain levels of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α), synaptic pathology,

and impaired insulin signaling in the hippocampus. Defective brain insulin signaling has been suggested to contribute to the cognitive deficits in animals and patients with AD.^[9]

Interestingly, several groups have raised the 'metal hypothesis' of AD.^[10] This hypothesis is mainly based upon experimental results. First, several metal ions, such as zinc, iron, and copper, are all increased in the aged brain. It has been reported that the content of metal ions in the brain of AD patients is 37 times greater than that in the brain of non-AD people and that those metal ions in brain homeostasis may result in the development of AD.^[10] There

* Correspondence to: Amanda Souza, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: amandass@bioqmed.ufrj.br

* Ricardo Lopes, Nuclear Instrumentation Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: ricardo@lin.ufrj.br

Presented at EXRS2016 - European Conference on X-ray Spectrometry, Gothenburg, Sweden, 19–24 June 2016.

^a Nuclear Instrumentation Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Physics Institute, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ANEXO C

Trabalho Submetido a X-Ray Spectrometry

Using a portable total reflection X-ray fluorescence system for a multielement analysis of Swiss mice brains with experimental Alzheimer's disease induced by β -amyloid oligomers.

D.S. Almeida^[1], M.M. Brígido^[2], M.J. Anjos^[2], S.T. Ferreira^[3,4], A.S. Souza^[3,4],
R.T. Lopes^[1]

[1] Nuclear Instrumentation Laboratory - Federal University of Rio de Janeiro,

[2] Physics Institute - State University of Rio de Janeiro,

[3] Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho - Federal University of Rio de Janeiro,

[4] Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis - Federal University of Rio de Janeiro.

E-mail: dani.almeida84@gmail.com

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible disorder whose pathological features include β -amyloid ($A\beta$) plaques, neuronal and synaptic loss. Metals such as iron, copper and zinc are increased in the brains of patients with AD. Those metals can interact with $A\beta$ resulting in the promotion of $A\beta$ deposition and formation plaque. However, no study analyzing the effects of single injection of β -amyloid soluble oligomers ($A\beta$ Os) in the elements' homeostasis in mice was developed. Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF) is a multielement analytical technique that can be utilized to identify and quantify trace elements present in a sample at very low concentrations. In this study, in order to evaluate the concentration of metals in brain regions of Swiss mice three groups of females and three of males were studied: control, AD10 and AD100. The AD groups received an $A\beta$ Os' intracerebroventricular injection so as to induced experimental AD. Afterwards, a craniotomy was performed and six brain compartments were dissected and evaluated. TXRF measurements were performed using a portable total reflection X-ray fluorescence system which uses an X-ray tube with a molybdenum anode and a detector Si-PIN. It proved determined the following elements' concentrations: phosphorus, sulphur, potassium, iron, copper, zinc and rubidium. Results showed differences in the elemental concentration in some brain regions between AD groups. These alterations suggest that $A\beta$ Os acts quickly, even before the amyloid plaques' formation, explaining cognitive deficits independently of amyloid plaques. This study helped to understand that this modification on elemental concentration can be influenced by $A\beta$ Os.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible disorder whose pathological features include β -amyloid plaques, neurofibrillary tangles, neuronal and synaptic loss. The $A\beta$ plaque is one of major pathological characteristics of AD brains, which is mainly composed of $A\beta$ peptide [1]. The amyloid hypothesis of AD asserts that the accumulation and deposition of fibrillar $A\beta$ are the main factor of neurodegeneration and cognitive decline leading to dementia [2]. However, in AD, it has been pointed out that there is