

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

# **A DOENÇA DE ALZHEIMER COMO UM PROCESSO NEUROINFLAMATÓRIO**

RODRIGO MEDEIROS

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de doutor em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis - SC  
2007

Medeiros, Rodrigo, A doença de Alzheimer como um processo neuroinflamatório. Florianópolis, 2007, 139 p. Tese (Doutorado em farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto  
Defesa: 28/03/2007.

A doença de Alzheimer é caracterizada pelo acúmulo de placas amilóides e pelo dano cognitivo nos indivíduos acometidos. Dados recentes sugerem que o processo inflamatório apresenta importante papel no desenvolvimento e na progressão da doença de Alzheimer. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de determinar a possível relação entre a inflamação e os déficits cognitivos observados na doença de Alzheimer, através de estudos *in vivo* e *in vitro*. Os dados do presente trabalho demonstram que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> resultou em prejuízos de aprendizado e memória em camundongos. Tal efeito parece estar associado a um processo de disfunção sináptica e ativação glial. O bloqueio farmacológico do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ou da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), reduzem o dano cognitivo induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Resultados similares foram observados em animais com deleção gênica para o receptor do TNF- $\alpha$  tipo 1 (TNFR1) ou para a iNOS. A administração da A $\beta$ <sub>1-40</sub> resultou em aumento na expressão do TNF- $\alpha$  e indução de alterações nos parâmetros oxidativos no córtex pré-frontal e hipocampo. Além disso, a A $\beta$ <sub>1-40</sub> promoveu a ativação das vias de sinalização da proteína quinase JNK/c-Jun e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, resultando no aumento da expressão da iNOS nas mesmas áreas cerebrais. O pré-tratamento dos animais com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo reduziu todas as alterações bioquímicas e moleculares induzidas pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Estes resultados sugerem o TNF- $\alpha$  e a iNOS como importantes alvos na doença de Alzheimer. Por fim, no presente estudo, foi investigado, através de ferramentas farmacológicas e genéticas, o papel do sistema cininas nos prejuízos cognitivos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Nossos dados demonstram que o tratamento com o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub>, Hoe140, é capaz de reduzir os déficits de aprendizado e memória induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> 7 ou 30 dias após o tratamento. Resultados similares foram observados em animais com deleção do gene para o receptor B<sub>2</sub>. Por outro lado, o tratamento com o antagonista do receptor B<sub>1</sub>, a des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK ou a deleção do gene para o receptor B<sub>1</sub> inibiu os efeitos da A $\beta$ <sub>1-40</sub>, apenas quando a avaliação foi feita 30 dias após o tratamento. Estudos de biologia molecular revelaram que o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> promoveu aumento dependente do tempo e sustentado na expressão do receptor B<sub>1</sub> no córtex pré-frontal e no hipocampo. Todavia, nenhuma alteração no padrão de expressão do receptor B<sub>2</sub> foi observada após a injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Estes resultados indicam que os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas apresentam importante papel nos prejuízos cognitivos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Em conjunto, os resultados do presente estudo apontam o TNF- $\alpha$ , a iNOS e os receptores para as cininas como potenciais alvos terapêuticos no tratamento da doença de Alzheimer.

Doença de Alzheimer,  $\beta$ -amilóide, óxido nítrico sintase induzida, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , cininas

*"...somos aquilo que recordamos, literalmente. Não podemos fazer aquilo que não sabemos como fazer, nem comunicar nada que desconhecamos, isto é, nada que não esteja na nossa memória... ...Eu sou quem sou, cada um é quem é, porque todos lembramo-nos de coisas que nos são próprias e exclusivas, e não pertencem a mais ninguém. As nossas memórias fazem com que cada ser humano ou animal seja um ser único, um indivíduo"*

*Iván Izquierdo*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador **Dr. João Batista Calixto**, por ter aberto as portas da carreira científica, por toda dedicação, amizade, paciência e pelo exemplo de competência.

Em especial a minha namorada **Giselle Fazzioni Passos**, por milhares de motivos, mas especialmente por sempre ter acreditado e me amado.

A minha mãe - **Arleni Demo** - e minha irmã - **Camila Demo Medeiros**. Pessoas sempre presentes em minha vida, pelos seus exemplos de dedicação, força e persistência, pelo apoio, incentivo e principalmente pelo grande amor dedicando durante toda minha vida.

A grande amiga **Maria Martha Campos** pela paciência e atenção empregadas para me instruir e auxiliar durante a minha formação como farmacologista.

Ao **Rui Daniel Schröder Prediger** pela amizade, incentivo, troca de idéias e apoio no desenvolvimento de inúmeros experimentos.

Aos amigos **Filipe S. Duarte**, **Pablo Pandolfo** e **Cláudia P. Figueiredo** pela força na realização de inúmeros experimentos.

Ao **Jeferson L. Franco** e ao **Prof. Alcir L. Dafre** pelo auxílio na realização dos experimentos enzimáticos.

A **Dra. Gabriella Di Giunta**, por abrir as portas do laboratório de patologia do hospital universitário para a realização dos experimentos de imunohistoquímica.

As minhas amigas **Elizabeth, Nara, Patrícia, Aline e Juliana**, e ao amigo **Gustavo** pelo carinho e amizade.

Ao **Prof. Reinaldo N. Takahashi** pelo grande apoio e amizade.

A **Diana** e ao **Pedro**, por terem me ajudado sempre que precisei, e que indiretamente auxiliaram-me no desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais **amigos e colegas** do Departamento de Farmacologia.

A todos os **professores e funcionários** do Departamento de Farmacologia.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>Abreviaturas</b> .....	i
<b>Resumo</b> .....	ii
<b>Abstract</b> .....	iv
<b>Introdução</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	20
Objetivo geral.....	20
Objetivos específicos .....	20
<b>Matérias e Métodos</b> .....	22
Animais .....	22
Administração intracerebroventricular da $\beta$ -amilóide .....	23
Teste do campo aberto.....	24
Labirinto Aquático de Morris.....	24
Preparo dos cortes histológicos e reativação antigênica.....	26
Detecção imunológica .....	27
Coleta dos tecidos .....	29
Determinação de marcadores do estresse oxidativo.....	29
Medida dos níveis de glutathiona total (GSH total) .....	30
Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) .....	31
Atividade da enzima glutathiona redutase (GR) .....	31
Extração de RNA total .....	32
Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase .....	33
Preparação das frações de proteínas celulares para imunodeteção de proteínas.....	34
Ensaio de imunodeteção ("western blot") .....	35
Análise estatística .....	36
<b>Resultados</b> .....	38
Caracterização do efeito da administração intracerebroventricular dos peptídeos $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{40-1}$ no aprendizado e memória espacial de camundongos.....	38
Papel do TNF- $\alpha$ no dano cognitivo induzido pela $A\beta_{1-40}$ .....	40

Papel da iNOS no dano cognitivo induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	43
Participação do TNF- $\alpha$ e iNOS na disfunção sináptica induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>	45
A $\beta$ <sub>1-40</sub> induz ativação de astrócitos.....	50
A $\beta$ <sub>1-40</sub> estimula a expressão da iNOS através do aumento na síntese de TNF- $\alpha$ .....	53
Estresse oxidativo induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> depende do TNF- $\alpha$ .....	56
A via da JNK/c-Jun regula a expressão da iNOS induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	61
O TNF- $\alpha$ regula a expressão da iNOS induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> através da via do NF- $\kappa$ B .....	65
Participação dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> para cininas na prevenção dos prejuízos cognitivos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	69
Participação dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> para cininas na reversão dos danos cognitivos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	72
Avaliação da expressão dos receptores para as cininas após a injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	77
<b>Discussão</b> .....	80
<b>Conclusão</b> .....	105
<b>Bibliografia</b> .....	106

## SUMÁRIO DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> – Efeitos de uma única injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) ou do peptídeo inverso A $\beta$ <sub>40-1</sub> (400 pmol/camundongo) no aprendizado e memória espacial de camundongos <i>Swiss</i> .....	39
<b>Tabela 1</b> – Efeitos da administração intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo), do peptídeo inverso A $\beta$ <sub>40-1</sub> (400 pmol/camundongo) ou da solução controle (veículo, PBS) (8 dias antes dos experimentos) nos parâmetros comportamentais de camundongos <i>Swiss</i> testados no campo aberto (por 5 min).....	40
<b>Figura 2</b> – Envolvimento do TNF- $\alpha$ no dano cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	42
<b>Figura 3</b> – Envolvimento da iNOS no dano cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	44
<b>Figura 4</b> – A disfunção sináptica precede a morte neuronal após o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	46
<b>Figura 5</b> – O TNF- $\alpha$ e a iNOS participam da disfunção sináptica induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	48
<b>Figura 6</b> – Figuras representativas da reação de imunohistoquímica para a proteína pré-sináptica sinaptofisina analisada nas subregiões hipocâmpais CA1, CA2 e CA3, e no córtex parietal como medida de densidade sináptica.....	50
<b>Figura 7</b> – Ativação dos astrócitos pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	52
<b>Figura 8</b> – Participação do TNF- $\alpha$ na indução da iNOS pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	55
<b>Figura 9</b> – A $\beta$ <sub>1-40</sub> altera parâmetros oxidativos celulares no cérebro.....	58
<b>Figura 10</b> – Bloqueio do TNF- $\alpha$ previne alterações nos parâmetros oxidativos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	60
<b>Figura 11</b> – Administração i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> promove a ativação da JNK.....	63
<b>Figura 12</b> – Ativação da c-Jun pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	64
<b>Figura 13</b> – A ativação do NF- $\kappa$ B é dependente da via do TNF- $\alpha$ .....	67
<b>Figura 14</b> – Administração i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> induz a expressão da iNOS através das vias JNK/c-Jun e NF- $\kappa$ B.....	68
<b>Figura 15</b> - Efeito do bloqueio do receptor B <sub>1</sub> para cininas na prevenção dos prejuízos cognitivos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	70

<b>Figura 16</b> – Efeito do bloqueio do receptor B <sub>2</sub> para cininas na prevenção dos prejuízos cognitivos induzidos pela Aβ <sub>1-40</sub> .....	71
<b>Figura 17</b> – Reversão do dano cognitivo induzido pela Aβ <sub>1-40</sub> através do bloqueio do receptor B <sub>2</sub> .....	73
<b>Figura 18</b> – Reversão tardia do dano cognitivo induzido pela Aβ <sub>1-40</sub> através do bloqueio do receptor B <sub>1</sub> .....	75
<b>Figura 19</b> – Reversão tardia do dano cognitivo induzido pela Aβ <sub>1-40</sub> através do bloqueio do receptor B <sub>2</sub> .....	76
<b>Figura 20</b> – Efeito da Aβ <sub>1-40</sub> na expressão dos receptores para cininas.....	78
<b>Figura 21</b> – Papel do TNF-α e da iNOS no dano neuronal induzido pela injeção i.c.v. da Aβ <sub>1-40</sub> .....	98
<b>Figura 22</b> – Papel dos receptores para cininas no dano cognitivo induzido pela injeção i.c.v. da Aβ <sub>1-40</sub> .....	104

## **ABREVIACÕES**

<b>A<math>\beta</math></b>	$\beta$ -Amilóide
<b>APP</b>	Proteína precursora amilóide
<b>i.c.v.</b>	Intracerebroventricular
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TNFR</b>	Receptor do TNF
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>JNK</b>	Proteína quinase c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear- $\kappa$ B
<b>AP-1</b>	Proteína de ativada-1
<b>LPS</b>	Lipolissacardeo
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	xido nítrico sintetase induzida
<b>NO</b>	xido nítrico
<b>LTP</b>	Potenciação de longo prazo
<b>B<sub>1</sub>R</b>	Receptor B <sub>1</sub>
<b>B<sub>2</sub>R</b>	Receptor B <sub>2</sub>
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida
<b>GSH</b>	Glutaciona
<b>GPx</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GR</b>	Glutaciona redutase

## **RESUMO**

A doença de Alzheimer é caracterizada pelo acúmulo de placas amilóides e pelo dano cognitivo nos indivíduos acometidos. Dados recentes sugerem que o processo inflamatório apresenta importante papel no desenvolvimento e na progressão da doença de Alzheimer. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de determinar a possível relação entre a inflamação e os déficits cognitivos observados na doença de Alzheimer, através de estudos *in vivo* e *in vitro*. Os dados do presente trabalho demonstram que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> resultou em prejuízos de aprendizado e memória em camundongos. Tal efeito parece estar associado a um processo de disfunção sináptica e ativação glial. O bloqueio farmacológico do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ou da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), reduzem o dano cognitivo induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Resultados similares foram observados em animais com deleção gênica para o receptor do TNF- $\alpha$  tipo 1 (TNFR1) ou para a iNOS. A administração da A $\beta$ <sub>1-40</sub> resultou em aumento na expressão do TNF- $\alpha$  e indução de alterações nos parâmetros oxidativos no córtex pré-frontal e hipocampo. Além disso, a A $\beta$ <sub>1-40</sub> promoveu a ativação das vias de sinalização da proteína quinase JNK/c-Jun e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, resultando no aumento da expressão da iNOS nas mesmas áreas cerebrais. O pré-tratamento dos animais com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo reduziu todas as alterações bioquímicas e moleculares induzidas pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Estes resultados sugerem o TNF- $\alpha$  e a iNOS como importantes alvos na doença de

Alzheimer. Por fim, no presente estudo, foi investigado, através de ferramentas farmacológicas e genéticas, o papel do sistema cininas nos prejuízos cognitivos induzidos pela  $A\beta_{1-40}$ . Nossos dados demonstram que o tratamento com o antagonista seletivo do receptor  $B_2$ , Hoe140, é capaz de reduzir os déficits de aprendizado e memória induzidos pela  $A\beta_{1-40}$  7 ou 30 dias após o tratamento. Resultados similares foram observados em animais com deleção do gene para o receptor  $B_2$ . Por outro lado, o tratamento com o antagonista do receptor  $B_1$ , a des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK ou a deleção do gene para o receptor  $B_1$  inibiu os efeitos da  $A\beta_{1-40}$ , apenas quando a avaliação foi feita 30 dias após o tratamento. Estudos de biologia molecular revelaram que o tratamento com  $A\beta_{1-40}$  promoveu aumento dependente do tempo e sustentado na expressão do receptor  $B_1$  no córtex pré-frontal e no hipocampo. Todavia, nenhuma alteração no padrão de expressão do receptor  $B_2$  foi observada após a injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ . Estes resultados indicam que os receptores  $B_1$  e  $B_2$  para as cininas apresentam importante papel nos prejuízos cognitivos induzidos pela  $A\beta_{1-40}$ . Em conjunto, os resultados do presente estudo apontam o TNF- $\alpha$ , a iNOS e os receptores para as cininas como potenciais alvos terapêuticos no tratamento da doença de Alzheimer.

## ***ABSTRACT***

Increased brain deposition of amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) and cognitive deficits are classical signals of Alzheimer's disease, which have been highly associated to inflammatory alterations. The present work was designed to determine the correlation between inflammatory process and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, by means of both *in vivo* and *in vitro* approaches. The intracerebroventricular injection of  $A\beta_{1-40}$  in mice resulted in marked deficits of learning and memory, according to assessment in the Water maze paradigm. This cognition impairment seems to be related to synapse dysfunction and glial cell activation. The pharmacological blockage of either  $TNF-\alpha$  or iNOS reduced the cognitive deficit evoked by  $A\beta_{1-40}$  in mice. Similar results were obtained in  $TNF-\alpha$  receptor 1 and iNOS knockout mice.  $A\beta_{1-40}$  administration induced an increase of  $TNF-\alpha$  expression and oxidative alterations in prefrontal cortex and hippocampus. Likewise,  $A\beta_{1-40}$  led to activation of both c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK)/c-Jun and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), resulting in iNOS up-regulation in both brain structures. The anti- $TNF-\alpha$  antibody reduced all the molecular and biochemical alterations promoted by  $A\beta_{1-40}$ . These results provide new insights in mouse models of Alzheimer's disease, revealing  $TNF-\alpha$  and iNOS as central mediators of  $A\beta$  action. In addition, the present study investigated, by means of genetic or pharmacological approaches, the role of kinin system in the  $A\beta_{1-40}$  cognitive effects on water maze paradigm. Spatial learning and memory deficits observed at 7 and 30 days after  $A\beta_{1-40}$  treatment were significantly reduced by the i.c.v. administration of kinin B<sub>2</sub> receptor antagonist Hoe 140. Similar

effect was found in mice lacking kinin B<sub>2</sub> receptors. On the other hand, genetic deletion of inducible kinin B<sub>1</sub> receptor or its blockage by i.c.v. injection of des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-bradykinin attenuated only the long-term (30 days after treatment) cognitive deficits induced by A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Moreover, treatment with A $\beta$ <sub>1-40</sub> resulted in a sustained increase in the expression of the kinin B<sub>1</sub> receptor in the hippocampus and prefrontal cortex of mice, while it did not alter the expression of kinin B<sub>2</sub> receptors in these brain areas. These findings provide convincing evidence that kinins acting at central nervous system B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors exert a critical role in the spatial learning and memory deficits induced by A $\beta$  peptide in mice. Therefore, pharmacological blockers of TNF- $\alpha$ , iNOS or kinin receptors could be of potential interest for the development of drugs to treat Alzheimer's disease.

## **INTRODUÇÃO**

Desde o início do século passado, mas principalmente nas últimas duas décadas, a humanidade vem passando por uma transição demográfica evidente, sendo que as sociedades estão deixando de ser formadas predominantemente por populações jovens e adultas para se transformarem em sociedades compostas por pessoas cada vez mais idosas. A Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu que a “era do envelhecimento” teve início em 1975 e que essa tendência deverá se estender por mais cinquenta anos, isto é, o crescimento deverá ocorrer até o ano 2025. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a Europa ocupa a primeira posição na proporção da população com mais de sessenta anos de idade (19,8 %), seguida pela América do Norte (16,3 %) (IBGE, 2000). Este fenômeno de envelhecimento populacional é também verificado no Brasil. Com base no censo de 2000, existem aproximadamente 10 milhões de idosos no Brasil, sendo que nos próximos 20 anos, este valor poderá ultrapassar os 30 milhões, vindo a representar aproximadamente 13 % da população brasileira e a sexta maior população de idosos do mundo (IBGE, 2000). Embora estes números reflitam um claro avanço na qualidade de vida de parte da população, eles também alertam para a possibilidade de que, num futuro próximo, cresça significativamente o número de pessoas acometidas pelos chamados “males da idade”. Dentre tais patologias, destaca-se a doença de Alzheimer.

A doença de Alzheimer foi descrita inicialmente pelo médico alemão Alois Alzheimer, em 1906, durante o 37º Congresso do Sudoeste da Alemanha

de Psiquiatria, na cidade de Tübingen. Durante sua conferência intitulada "*Eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*" (*Uma Doença Peculiar dos Neurônios do Córtex Cerebral*) Alzheimer definiu seu achado como uma patologia neurológica, não reconhecida, que cursa com demência, destacando os sintomas de déficit de memória, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras. Posteriormente, Alzheimer ainda viria a descrever os aspectos anatomopatológicos da doença, cujas principais características eram o acúmulo de placas senis e de emaranhados neurofibrilares e a perda neuronal (Moller e Graeber, 1998; Goedert e Spillantini, 2006).

Em 1910, na oitava edição do "*Handbook of Psychiatry*", Emil Kraepelin, após estudar casos semelhantes, propôs o nome de doença de Alzheimer em homenagem ao seu descobridor (Maurer et al., 1997, Moller e Graeber, 1998). Inicialmente, essa denominação era utilizada para os casos de demência pré-senil. Em 1968, um estudo demonstrou que os achados anatomopatológicos característicos da então denominada doença de Alzheimer ou demência pré-senil também apareciam em indivíduos com demência senil, em que os sintomas se iniciam aos 65 anos ou após essa idade, sendo então considerados como parte da mesma entidade patológica (Blessed et al., 1968). Um estudo anatomopatológico publicado em 1970 demonstrou que a maioria das demências que ocorrem no período senil, são resultados da doença de Alzheimer (Tomlinson et al., 1970). A partir de então, essas duas formas de demência divididas como pré-senil e senil

pela idade, passaram a ser chamadas e consideradas como uma única entidade: “doença de Alzheimer” (Blennow e Willian, 1992).

A susceptibilidade à doença de Alzheimer é resultante de múltiplos determinantes ambientais e genéticos que interagem durante a vida. Os fatores de risco relacionados à doença de Alzheimer compreendem: baixa escolaridade, traumatismo craniano associado à perda de consciência, sexo feminino, depressão, diabetes mellitus, hipertensão arterial, fumo, hiperinsulinemia, inatividade física, fibrilação arterial, dieta rica em gorduras e fatores genéticos (Cotman e Berchtold, 2002; Ritchie e Lovestone, 2002; Mattson, 2003; Gorelick, 2004; Luchsinger e Mayeux, 2004). Quanto ao último, estão incluídas anormalidades em genes localizados nos cromossomos 21 (gene codificador da proteína precursora amilóide, APP), 14 (gene da presenilina 1), 19 (relacionado à apolipoproteína E, especificamente ao alelo  $\epsilon 4$ ), 1 (gene da presenilina 2) e 12 (codificador da proteína relacionada ao receptor de LDL) (Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995; Hardy, 1997; Blennow et al., 2006). Contudo, o principal fator de risco associado à doença de Alzheimer é a idade. Estimativas indicam que a doença acomete 8-15 % da população com mais de 65 anos, sendo que a partir dessa idade o risco dobra a cada cinco anos. Atualmente, existem em todo o mundo, aproximadamente 25 milhões de pessoas com a doença de Alzheimer, o que demonstra sua grande importância. Nos países desenvolvidos, a doença de Alzheimer representa a terceira causa de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e para o câncer

(Mattson, 2004; Mount e Downton, 2006). No Brasil, não existem dados precisos sobre o número de pessoas com a doença.

Nos estágios iniciais da doença de Alzheimer, há alguma preservação da memória, mas, conforme a enfermidade evolui, a incapacidade de lembrança torna-se generalizada. A dificuldade de aquisição de novas informações aumenta até não haver mais novos aprendizados. Na linguagem, ocorre perda de fluência verbal, esvaziamento de conteúdos e diminuição da compreensão, além de erros de leitura e escrita. Além disso, o paciente perde progressivamente habilidades visuo-espaciais. Numa etapa avançada, a enfermidade traz dificuldades de expressão, movimentação e poder de reconhecimento perceptivo sensorial. As alterações psíquicas e comportamentais ocorrem em até 75 % dos casos, comprometendo a vida social e ocupacional. Os sintomas incluem quadros depressivos e psicóticos (alucinações e delírios), apatia, agressividade, agitação psicomotora, condutas repetitivas, perturbações no ciclo de sono-vigília e mudanças nos hábitos de locomoção, como, por exemplo, saídas a esmo e perambulações (McKhann et al., 1984; Romanelli et al. 1990; Morris e Rubin 1991; Mortimer et al., 1992; Walsh e Selkoe, 2004).

Ainda não foram identificados marcadores biológicos ou características clínicas que estabeleçam um diagnóstico definitivo para a doença de Alzheimer. Este só é obtido com a demonstração de lesões neuropatológicas no cérebro (Gearing et al., 1995). Do ponto de vista anatomopatológico, observa-se no cérebro de indivíduos com a doença de Alzheimer atrofia cortical difusa, presença de grande número de placas senis

e de emaranhados neurofibrilares, degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal (Dickson, 1997; Gomez-Isla et al., 1997; Braak e Braak, 1998; Uylings e de Brabander, 2002).

Os emaranhados neurofibrilares e as placas senis podem estar presentes nos cérebros normalmente senis, mas em menor quantidade e com distribuição menos extensa. Acredita-se que a concentração das placas senis esteja correlacionada ao grau de demência nos afetados (Selkoe, 1991; Hardy e Higgins, 1992; Walsh e Selkoe, 2004). Os emaranhados neurofibrilares são constituídos primariamente de proteínas *Tau* associadas à microtúbulos. As proteínas *Tau* estabilizam os microtúbulos do citoesqueleto neural, sendo esta função regulada por um processo de fosforilação e defosforilação. Nos neurônios que sofrem degeneração, as proteínas *Tau* associadas a microtúbulos tornam-se anormalmente hiperfosforiladas e se acumulam na forma de filamentos emaranhados helicoidais pareados (Nagy et al., 1995). Por sua vez, as placas senis são constituídas da deposição de fragmentos amilóides no parênquima cerebral. A  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) é um fragmento proteolítico formado a partir de uma glicoproteína transmembrânica maior, a proteína precursora amilóide (APP), que sofre a ação das enzimas proteolíticas  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases. Os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade da  $A\beta$  são complexos, mas parecem envolver a quebra da homeostase intracelular do cálcio e potássio, indução de estresse oxidativo e ativação do processo de morte celular. Além disso, transtornos da transmissão da acetilcolina e acetiltransferases ocorrem freqüentemente nos indivíduos afetados (Haass, 2004; Mattson, 2004).

Avanços recentes na compreensão dos mecanismos patofisiológicos relacionados à doença de Alzheimer apontam para novas estratégias no desenvolvimento de drogas. Os modelos animais têm contribuído consideravelmente para estes avanços e têm um papel ainda maior na avaliação de eventuais drogas com potencial terapêutico, não apenas de aliviar a demência associada com a doença de Alzheimer, mas de modificar o processo da doença (Van Dam e De Deyn, 2006). As ferramentas que vêm sendo utilizadas por grupos de pesquisa para estudar a doença de Alzheimer em animais de laboratório são basicamente duas: a primeira é deixar o animal envelhecer, fazendo com que ele passe a apresentar espontaneamente um conjunto de sintomas, dentre eles prejuízos sensoriais e cognitivos, semelhantes aos observados no decurso da doença (Campbell et al., 1980; Hazzard, 1991; Prediger et al., 2005a, 2006). Entretanto, esta metodologia demanda tempo, dinheiro e logística que raramente são disponíveis em laboratórios de pesquisa brasileiros.

Outra metodologia que vem sendo aplicada para estudar os processos relacionados ao desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer consiste na utilização de modelos capazes de induzir o acúmulo da A $\beta$  no cérebro de animais. Prejuízos cognitivos têm sido documentados tanto em camundongos geneticamente modificados, que apresentam uma expressão aumentada da APP (Hsiao et al., 1996; Westerman et al., 2002), quanto em roedores após a administração central aguda ou crônica dos fragmentos A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou A $\beta$ <sub>1-42</sub>, que são análogos dos peptídeos encontrados nas placas senis dos pacientes com a doença de Alzheimer. Até o presente

momento, tem sido demonstrado que a administração central destes fragmentos em roedores é capaz de promover um prejuízo significativo nos testes de esQUIVA ativa (Flood et al., 1991; McDonald et al., 1994) e esQUIVA inibitória (Giovannelli et al., 1995; Harkany et al., 1999), bem como nos testes de reconhecimento social (Terranova et al., 1996), labirinto em Y (McDonald et al., 1994, 1996) e labirinto aquático de Morris (Nitta et al., 1994). Todavia, apesar da extensa literatura indicando os prejuízos cognitivos induzidos pela proteína A $\beta$ , os mecanismos celulares e moleculares pelos quais estes se desenvolvem ainda não estão totalmente esclarecidos.

O tratamento da doença de Alzheimer inclui estratégias farmacológicas e intervenções psicossociais para o paciente e seus familiares. Inúmeras substâncias psicoativas têm sido propostas para restabelecer ou preservar a cognição do paciente (Mount e Downton, 2006). A reposição da acetilcolina tem mostrado eficácia na melhora da capacidade cognitiva e do comportamento de portadores da doença. Os medicamentos usados nesse tipo de terapia são os inibidores da acetilcolinesterase. Essas drogas têm efeito sintomático discreto sobre a cognição, algumas vezes beneficiando as alterações psíquicas da demência. Acredita-se também que elas possam retardar a evolução natural da doença, possibilitando uma melhora temporária no estado funcional do paciente (Mount e Downton, 2006; Blennow et al., 2006). Além disso, outras abordagens denominadas por convenção de “terapias modificadoras da doença de Alzheimer” (*disease-modifying therapies*) têm sido empregadas com o objetivo de interferir com mecanismos essenciais da

doença. Entre algumas das abordagens empregadas está o bloqueio da A $\beta$  e seus inúmeros mecanismos neurotóxicos (primários e secundários) e dos processos que levam à hiperfosforilação da proteína *Tau* e à disfunção e degeneração do citoesqueleto microtubular. A utilização destas terapias visa impedir a morte neuronal, atenuando assim a evolução do processo degenerativo e a evolução para a demência (Dewachter e Van Leuven, 2002; John et al., 2003; Roberds et al., 2001; Ritchie et al., 2003; Schenk et al., 1999; McLaurin et al., 2002).

Estudos recentes também têm indicado que o dano neuronal progressivo associado à doença pode ser conseqüência de reações inflamatórias locais no sistema nervoso central (Akiyama et al., 2000a; Tuppo e Arias, 2005; Wyss-Coray, 2006). Neste sentido, tem sido proposto que uma fagocitose ineficiente da A $\beta$  por parte da microglia, e a conseqüente hiperativação celular e liberação de mediadores inflamatórios e fatores neurotóxicos, contribuiria de maneira decisiva no processo neurodegenerativo verificado na doença de Alzheimer (Akiyama et al., 2000). Em acordo com esta hipótese, tem sido demonstrado um aumento nos níveis de diversos mediadores pró-inflamatórios no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer (Griffing et al., 1989; Pasinetti e Aisen, 1998; Ho et al., 1999; Moore e O'Banion, 2002; Galimberti et al., 2003). Corroborando esta idéia, estudos clínicos indicam que o tratamento prolongado com alguns antiinflamatórios não-esteroidais (ibuprofeno, indometacina e aspirina) ou substâncias antioxidantes (estrogênio e vitamina E), é capaz de reduzir a prevalência da doença de Alzheimer e melhorar os sintomas de

pacientes acometidos por esta patologia (Rogers et al., 1993; McGeer et al., 1996; In't Veld et al., 2001; Zandi et al., 2002, Sano et al., 1997; Henderson, 1997).

Dentre os mediadores associados à doença de Alzheimer pode-se destacar a citocina fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ . Essa citocina foi descrita inicialmente em meados de 1970 por Lloyd Old e colaboradores (Carswell et al., 1975) como um fator sorológico induzido por endotoxina que era capaz de causar a necrose de certos tumores murinos *in vivo*. Posteriormente, em 1984, foi isolado o TNF- $\alpha$  derivado de produtos bacterianos e, ao longo das últimas décadas, vários estudos têm identificado uma superfamília de ligantes e receptores relacionados a esta molécula (Paul et al., 2006). O TNF- $\alpha$  é sintetizado como uma proteína não glicosilada transmembrânica (proteína precursora), que posteriormente é processada para uma forma homotrimérica com massa molecular de 17 kDa. A enzima responsável pelo processamento do TNF- $\alpha$  é uma metaloproteinase específica, também chamada de enzima conversora do TNF- $\alpha$  (TACE) (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Além disso, o TNF- $\alpha$  pode existir como proteína de membrana com massa molecular de 26 kDa na sua forma não-clivada (Perez et al., 1990). Evidências experimentais revelaram que o TNF- $\alpha$  apresenta um importante papel como mediador e modulador da resposta inflamatória. Sua produção é realizada principalmente por células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, monócitos e linfócitos, em resposta a agentes patogênicos ou durante condições de estresse no organismo.

Através da associação com um de seus receptores celulares, denominados receptor do TNF tipo 1 (TNFR1 ou p55) e receptor do TNF tipo 2 (TNFR2 ou p75), o TNF- $\alpha$  ativa diferentes cascatas intracelulares que regulam diversas funções celulares, incluindo respostas inflamatórias, diferenciação e apoptose (Palladino et al., 2003). Enquanto o TNFR1 é expresso de maneira constitutiva na grande maioria das células, o TNFR2 apresenta sua expressão aumentada durante condições patológicas. Outra diferença importante entre esses receptores refere-se à sua estrutura. O TNFR1 apresenta em sua estrutura o domínio de morte (*death domain*, DD), que durante a sinalização se liga a molécula adaptadora TRADD (*TNFR-associated DD*) desencadeando, dentre outros efeitos, a ativação do processo de apoptose (Liu et al., 1996; Chen e Goeddel, 2002; Hallenbeck, 2002). Por outro lado, o TNFR2 não apresenta o DD, mas sim um domínio citoplasmático que se liga aos TRAFs (*TNFR-associated factors*) durante a sinalização. A ativação do TNFR2, por sua vez, tem sido associada à resposta inflamatória aguda (Segui et al., 2001; Kolesnick e Kronke, 1998; Hallenbeck, 2002). Todavia, é importante ressaltar que, na maioria das vezes, em função do estímulo primário, ambos os receptores são ativados simultaneamente e acabam desencadeando a ativação de vias de sinalização intrincadas e bastante complexas. De maneira geral, a ativação dos receptores para o TNF- $\alpha$  resulta na ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e da proteína I $\kappa$ B quinase (IKK), que por sua vez controlam a expressão de diferentes proteínas pela ativação de fatores de transcrição como a proteína ativada-1 (AP-1) e o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Brenner et al., 1989; DiDonato et al., 1997; Liu et al.,

1996; Wajant et al., 2003). Ao nível celular, a principal função atribuída ao TNF- $\alpha$  é sinalizar para a ativação da transcrição de outras proteínas envolvidas na resposta inflamatória, incluindo a interleucina (IL)-1, -6 e -8, as quimiocinas e as moléculas de adesão. Além disso, o TNF- $\alpha$  é um fator fundamental na regulação do balanço entre a ativação de vias de sinalização pró- e anti-apoptóticas no controle da proliferação celular e na resposta inflamatória. De modo interessante, a supressão do processo de apoptose geralmente resulta em resposta inflamatória (Baud e Karin, 2001).

Em relação ao sistema nervoso central, a micróglia e o astrócito são considerados os produtores primários de TNF- $\alpha$ . Durante processos patológicos no cérebro foram descritos tanto efeitos neuroprotetores quanto neurotóxicos exercidos pelo TNF- $\alpha$ . Estudos de deleção gênica indicam que o TNFR2 participa do processo de proteção contra a neurotoxicidade induzida pelo glutamato em camundongos (Marchetti et al., 2004). Além disso, o TNF- $\alpha$  parece estar envolvido na neuroproteção em resposta à toxicidade aguda induzida pelo óxido nítrico (Turrin e Rivest, 2006). Sriram e colaboradores (2006) demonstraram recentemente que a ausência dos receptores para o TNF- $\alpha$  aumenta a susceptibilidade dos camundongos aos efeitos neurotóxicos produzidos pelo MPTP (*1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) na região hipocampal do cérebro. Por outro lado, alguns estudos têm implicado o TNF- $\alpha$  na neurotoxicidade induzida pelo glutamato, através da ativação da microglia (Takeuchi et al., 2006). Ademais, a inibição aguda do TNF- $\alpha$  endógeno pelo tratamento com TNFR solúvel, anticorpos específicos ou oligonucleotídeos *antisense* reduz de maneira marcante o

dano cerebral induzido por isquemia ou trauma em roedores (Nawashiro et al., 1996; Barone et al., 1997; Mayne et al., 2001). Evidências indicam que na doença de Alzheimer há um aumento na expressão do TNFR1 no cérebro, bem como nos níveis de TNF- $\alpha$  no cérebro e plasma dos pacientes (Fillit et al., 1991; Tarkowski, 2002; Li et al., 2004). Recentemente, também foi demonstrado através de experimentos de eletrofisiologia em camundongos que o TNF- $\alpha$  apresenta um importante papel na redução da potenciação de longo prazo (LTP) induzida pela A $\beta$  (Wang et al., 2005). Entretanto, os mecanismos pelo qual o TNF- $\alpha$  exerce seus efeitos durante a doença de Alzheimer são pouco compreendidos.

Outra importante proteína integrante do processo inflamatório é a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), uma enzima envolvida na síntese do óxido nítrico (NO) (Xie et al., 1993; 1994; Kleinert et al., 2003). O NO foi inicialmente descrito por Furchgott e Zawadski (1980) como sendo um potente vasodilatador em resposta ao agonista muscarínico acetilcolina em tiras de aorta com endotélio intacto. Desconhecendo a etiologia da substância causadora do efeito, os autores a denominaram de EDRF (fator relaxante derivado do endotélio). Posteriormente, os grupos de Ignarro, Murad e Palmer mostraram, em estudos independentes, que o EDRF e o NO eram a mesma substância, sendo este sintetizado pelas células endoteliais através da L-arginina (Ignarro et al., 1987; Murad et al., 1987; Palmer et al., 1987). Esta descoberta deflagrou uma verdadeira explosão de pesquisas sobre os papéis fisiológico e patológico do NO nas mais diversas condições e tecidos. Atualmente, sabe-se que o NO é uma importante molécula

sinalizadora inter e intracelular envolvida na regulação de uma variedade de funções celulares biológicas (Hanafy et al., 2001; Ignarro et al., 2002; Alderton et al., 2001).

Nos tecidos, o NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, em uma reação de oxidação catalisada pelas isoenzimas NO sintases (NOS). As NOS são identificadas de acordo com o tipo celular ou as condições em que foram primeiramente descritas (Hanafy et al., 2001). Dessa maneira, existem três isoformas distintas de NOS: NOS endotelial (eNOS ou NOS III) encontrada na célula endotelial, célula epitelial e em miócito cardíaco; NOS neuronal (nNOS ou NOS I) encontrada em células neuronais e na musculatura esquelética; NOS induzível (iNOS ou NOS II) encontrada em macrófagos, hepatócitos, músculo liso e em vários outros tecidos (Alderton et al., 2001). A eNOS e a nNOS são enzimas expressas constitutivamente e sua ativação é dependente do aumento do cálcio intracelular. O NO formado por estas enzimas está relacionado a eventos fisiológicos como regulação do tônus vascular, neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária e da adesão celular, além do efeito antioxidante (Napoli e Ignarro, 2001; Cayatte et al., 1994; Kuhlencordt et al., 2001; Rand, 1992; Baranano e Snyder, 2001; Kobzik et al., 1994; Guzik et al., 2003). Por outro lado, a isoforma induzida da enzima é funcionalmente independente da concentração intracelular de cálcio e normalmente não é expressa constitutivamente, tendo sua expressão modulada em processos inflamatórios ou fisiopatológicos (Nathan et al., 1992; Hibbs et al., 1988; Marletta, 1994). A expressão da iNOS é evidenciada em uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, células

endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos depois da estimulação com lipopolissacárides (LPS), citocinas (como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) e outros agentes pró-inflamatórios. Uma vez expressa, a iNOS gera NO de maneira contínua e em grande quantidade. O NO proveniente da iNOS responde por efeitos protetores contra patógenos virais ou bacterianos (Bogdan, 2001) ou por efeitos citotóxicos, que incluem dano ao DNA, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), nitração de resíduos de tirosina e inibição da respiração mitocondrial, dentre outros (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995; Guzik et al., 2003; Gow et al., 2004; Vallance e Leiper, 2002). O dano celular induzido pelo NO é resultado de sua propriedade de espécie reativa e pela interação com o ânion superóxido formando peroxidonitrito, um potente agente oxidante (Javesghani et al., 2003). Por sua vez, o peroxinitrito estimula o processo inflamatório pela ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (Wu et al., 2004; O'Donnell et al., 1999; Stamler et al., 2001). Os efeitos deletérios do NO estão implicados na patologia de doenças inflamatórias como aterosclerose, artrite reumatóide, asma, diabetes, choque séptico, rejeição de transplantes, esclerose múltipla e doença inflamatória intestinal, dentre outras (Vallance e Leiper, 2002; Aktan, 2004; Vallance e Leiper, 2002). Dano neuronal e doenças cerebrais degenerativas, tais como a doença de Parkinson e Alzheimer, também estão associadas a síntese aumentada de NO (Christopherson e Bredt, 1997; Halliwell, 2001).

Nos últimos anos vem crescendo o número de trabalhos sugerindo o envolvimento do sistema caliceína-cininas na fisiopatologia da doença de

Alzheimer. As cininas constituem uma família de peptídeos biologicamente ativos formados em resposta a estímulos fisiológicos ou durante o processo inflamatório, a partir de  $\alpha$ -globulinas com múltiplos domínios, conhecidas como cininogênios. Tais precursores são clivados por um grupo de proteases conhecidas genericamente por calicreínas, que podem ser encontradas no sangue (calicreína plasmática) ou na maioria das glândulas exócrinas (calicreína tecidual) (Proud e Kaplan, 1988; Cassim et al., 2002; Kaplan et al., 2002). Uma vez liberadas, as cininas exercem uma série de efeitos biológicos, incluindo vasodilatação, hiperemia local, redução da pressão sangüínea, sensibilização de fibras aferentes sensoriais do tipo A $\delta$  e C, além de formação de edema em conseqüência do aumento da permeabilidade vascular. Suas ações parecem contribuir para a hipotensão e para o desenvolvimento do choque, observados na pancreatite, na sepse e na coagulação intravascular (Dendorfer et al. 1999; Calixto et al., 2000). Ademais, as cininas também são capazes de controlar o tônus de vários tipos de musculatura lisa, o transporte de glicose, além de estimularem a reabsorção óssea e a proliferação celular (Bhoola et al., 1992).

As ações das cininas são mediadas através de receptores específicos presentes na membrana celular. Dois subtipos de receptores para as cininas foram descritos há mais de 20 anos (Regoli e Barabé, 1980) e denominados B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Foram caracterizados inicialmente com base em critérios farmacológicos de ordem de potência dos agonistas em preparações de órgão isolado. Posteriormente, esta classificação foi confirmada através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos, obtidos por modificações ou

substituições dos aminoácidos que compõem a estrutura das cininas (Vavrek e Stewart, 1985; Regoli et al., 1994; Stewart et al., 1999). Mais recentemente, ambos os receptores foram clonados de várias espécies animais, inclusive de humanos, confirmando assim a existência dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> como produtos de genes distintos (Hess, 1997). Os receptores para as cininas pertencem à família de receptores compostos por 7 unidades transmembrana acoplados as proteínas G (McEachern et al., 1991; Hess et al., 1992; Menke et al., 1994; Pesquero et al., 1996). Apesar de serem acoplados aos mesmos mecanismos transducionais, os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> apresentam aproximadamente 36% de homologia na seqüência de aminoácidos (dependendo da espécie estudada), sendo esta homologia mais evidente nas 7 regiões transmembrana. Este grau de homologia entre os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> pode ser considerado baixo, uma vez que o receptor B<sub>1</sub> apresenta 30% de similaridade em relação ao receptor do tipo 1 para a angiotensina II (Hess, 1997).

Apesar das diferenças entre os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas, na maioria das vezes as vias de transdução acionadas pelos dois tipos de receptores são muito semelhantes (Liebmann e Böhmer, 2000; Liebmann, 2001). Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas são preferencialmente acoplados a proteínas das famílias G $\alpha$ i e G $\alpha$ q (Liao e Homcy, 1993) e sua ativação pode estar relacionada à estimulação direta ou indireta de diversas vias de sinalização intracelular. Estas vias incluem: fosfolipase C, fosfolipase D, aumento de cálcio intracelular, ativação de isoformas específicas da proteína quinase C, estimulação de canais de potássio

sensíveis ao cálcio, transporte de íons cloreto, ativação da adenilato ciclase, formação de óxido nítrico, aumento expressivo dos níveis de prostanóides em resposta à ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> ou, ainda, ativação da via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (Schanstra et al., 1999; Liebmann e Böhmer, 2000; Liebmann, 2001).

Sem dúvida, a principal diferença entre os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> está relacionada ao padrão de expressão destas duas proteínas. Tem sido largamente demonstrado que a maior parte das ações fisiológicas das cininas é mediada pela ativação dos receptores B<sub>2</sub>, enquanto que os receptores B<sub>1</sub> são responsáveis por amplificar e perpetuar a sinalização iniciada pela estimulação dos receptores B<sub>2</sub>. As respostas mediadas pela ativação de ambos os receptores são qualitativamente similares e geralmente envolvem a ativação dos mesmos tipos celulares (Marceau et al., 1998; Calixto et al., 2000). Desta forma, os receptores B<sub>2</sub> são expressos de forma constitutiva em vários órgãos, tecidos e tipos celulares, incluindo: células endoteliais, fibroblastos, epitélio glandular, rins, coração, musculatura esquelética, sistema nervoso central, musculatura lisa de vasos sanguíneos, ducto deferente, traquéia, intestino, útero e bexiga (Dendorfer et al., 1999). Por outro lado, um grande número de evidências indica que os receptores B<sub>1</sub> estão geralmente ausentes em tecidos de animais em condições normais, sendo rapidamente induzidos e modulados em diversos tipos celulares após longos períodos de incubação *in vitro*, após trauma tecidual ou infecções, ou ainda após o tratamento com endotoxinas bacterianas, adjuvante de Freund, citocinas pró-inflamatórias, luz ultravioleta, estresse térmico, dentre

outros estímulos (Marceau et al., 1998; Ahluwalia e Perretti, 1999; Calixto et al., 2000).

Em relação à doença de Alzheimer, sabe-se que áreas cerebrais que são acometidas nas fases iniciais da patologia apresentam uma expressão aumentada de vários elementos do sistema caliceína-cininas (Correa et al., 1979; Perry e Snyder, 1984; Murone et al., 1997; Raidoo e Bhoola, 1997; Chen et al., 2000). Além disso, foi verificado recentemente um aumento na transdução do sinal iniciado pela BK em fibroblastos isolados a partir de cérebros de portadores da doença de Alzheimer (estudo *post-mortem*), ocasionando uma hiperfosforilação da proteína *Tau*, sendo este considerado um dos primeiros eventos do processo neurodegenerativo associado à doença de Alzheimer (Jong et al., 2003). Huang e colaboradores (1998) demonstraram que a exposição da cultura de células do tipo PC12 à proteína A $\beta$  promove um aumento na produção de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e elevação dos níveis de cálcio citosólico induzidos pela BK, além de alteração no número e afinidade dos receptores para cininas. Em adição, a incubação de células endoteliais com a proteína A $\beta$  promove um aumento de três a quatro vezes na concentração de cininas nesta cultura (Wirth et al., 1999). De maneira interessante, Racchi e colaboradores (1998) demonstraram que o tratamento de fibroblastos humanos com BK promove um aumento na secreção da APP. Em conjunto, os resultados obtidos nestes estudos apontam para a existência de um possível “ciclo vicioso”, sendo que por um lado, a proteína A $\beta$  induz a liberação de BK e aumenta as respostas

celulares mediadas por seus receptores e, por outro, a BK estimula a secreção do precursor da proteína A $\beta$ , realimentando o ciclo.

Embora após os 101 anos da primeira descrição da doença da Alzheimer tenha-se conseguido algum avanço em termos de conhecimento científico, ainda parece faltar muito para o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas eficazes para o tratamento desta patologia tão devastadora. Neste sentido, uma melhor compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta doença torna-se imperativa. Como descrito anteriormente, a A $\beta$  apresenta um papel importante no desenvolvimento de várias alterações neuronais verificadas na doença de Alzheimer. Sendo assim, informações adicionais sobre os mecanismos moleculares relacionados às ações da A $\beta$  serão de grande valia para o desenvolvimento de abordagens mais racionais e eficazes para o tratamento dessa patologia. Neste sentido, o presente estudo procurou estabelecer possíveis relações entre a resposta inflamatória, as alterações moleculares e os danos cognitivos induzidos pela injeção i.c.v. da A $\beta$  em camundongos.

## OBJETIVOS

### *Objetivo Geral*

O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel das proteínas TNF- $\alpha$  e iNOS, bem como das cininas, sobre os prejuízos cognitivos induzidos pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) da proteína A $\beta_{1-40}$  em camundongos. Além disso, foram estudadas algumas das possíveis alterações moleculares induzidas pela A $\beta_{1-40}$  no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

### *Objetivos específicos*

- ✓ Investigar o efeito do bloqueio farmacológico ou genético da via do TNF- $\alpha$  e iNOS sobre o prejuízo cognitivo induzido pela injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A $\beta_{1-40}$  através do modelo do labirinto aquático de Morris (versão de memória espacial de referência).
- ✓ Avaliar a participação do TNF- $\alpha$  e da iNOS no processo de dano sináptico induzido pela administração i.c.v. de A $\beta_{1-40}$  através da imunodeteção da proteína pré-sináptica sinaptofisina.
- ✓ Caracterizar o perfil temporal de expressão do TNF- $\alpha$  e iNOS no córtex e hipocampo de camundongos após o tratamento com A $\beta_{1-40}$  através das técnicas de RT-PCR e/ou *western blot*.

- ✓ Determinar o perfil temporal de ativação da proteína quinase JNK e sua molécula alvo c-Jun após a injeção de A $\beta$ <sub>1-40</sub>.
- ✓ Analisar a possível ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no córtex pré-frontal e hipocampo induzida pela administração i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>.
- ✓ Caracterizar o efeito do bloqueio farmacológico do TNF- $\alpha$  sobre a ativação de diferentes vias de sinalização intracelulares (p. ex. JNK/c-Jun, NF- $\kappa$ B) induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>.
- ✓ Investigar a possível participação do TNF- $\alpha$  na regulação da expressão da iNOS no córtex pré-frontal e hipocampo induzida pelo tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub>.
- ✓ Determinar o efeito da administração de antagonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> para cininas na prevenção e/ou reversão do dano cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>.
- ✓ Analisar a influência da deleção gênica dos receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> para cininas sobre o prejuízo cognitivo induzido pelo tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub>.
- ✓ Caracterizar a possível modulação da expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas após diferentes períodos de tempo da administração i.c.v. da A $\beta$ <sub>1-40</sub>.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais*

Foram utilizados camundongos das linhagens: *Swiss*, *C57Bl/6*, nocaute para o *receptor-1 do TNF $\alpha$*  (*TNFR1<sup>-/-</sup>*) e nocaute para *iNOS* (*iNOS<sup>-/-</sup>*) (30 – 35 g) criados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Além disso, foram utilizados animais nocaute para o *receptor B<sub>1</sub>* (*B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>*) e nocaute para o *receptor B<sub>2</sub>* (*B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>*) das cininas, sendo que estes foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. João Bosco Pesqueiro do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A deleção da seqüência codificadora dos genes para o TNFR1 (Rothe et al., 1993), iNOS (MacMicking et al., 1995), B<sub>1</sub>R (Pesqueiro et al., 2000) ou B<sub>2</sub>R (Rupniak et al., 1997) foi realizada de acordo com metodologias descritas em trabalhos da literatura. Os animais foram alojados em grupos de 20 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em câmaras ventiladas (ALESCO<sup>®</sup>), a uma temperatura de 22 ± 2 °C, umidade entre 60 – 80 % e ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

O presente estudo seguiu as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (*NHI Publication No. 85-23, revisado em 1996*). Todos os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC.

### ***Administração intracerebroventricular da $\beta$ -amilóide***

O fragmento  $A\beta_{1-40}$  (Tocris, Ellisville, EUA) e o fragmento inverso  $A\beta_{40-1}$  (Bachem, Torrance, EUA) foram dissolvidos em PBS (pH 7,4; 1 mg/ml) e incubados a 37 °C por 3 – 4 dias, como descrito previamente (Coraci et al., 2002). A forma agregada dos fragmentos de  $A\beta$  (400 pmol/camundongo) ou a solução veículo (PBS) foram administradas por via intracerebroventricular (i.c.v.) como descrito por Laursen e Belknap (1986). Para tanto, foi utilizada uma microseringa Hamilton com agulha 28 gauges de 3 mm de comprimento. Esta foi inserida unilateralmente (1 mm) no ponto médio eqüidistante entre os olhos e a uma distância igual entre os olhos e as orelhas, perpendicular ao plano do crânio. As soluções foram injetadas gradualmente durante um intervalo de 5 s. Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados e a correta inserção da agulha foi avaliada através de análise histológica.

Alguns animais foram tratados com anticorpo específico anti-TNF- $\alpha$  (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo; i.c.v.; R&D Systems, MN, EUA) 15 min antes da injeção da  $A\beta_{1-40}$ . O inibidor da iNOS, aminoguanidina (AG, 100 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) foi administrado 1 h antes da injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  e 1 x ao dia durante os dias consecutivos até o momento da realização dos experimentos. Além disso, alguns animais foram tratados com o inibidor seletivo da proteína quinase JNK, SP600125 (50 mg/kg; i.p.; 1 h antes; Tocris) ou com o inibidor do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, PDTC (100 mg/kg, i.p., 1 h antes; Sigma-Aldrich). Por fim, foram realizados tratamentos com o antagonista seletivo do  $B_1R$ , des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (1, 10 ou 50

pmol/camundongo; i.c.v.) (Sigma-Aldrich) ou com o antagonista seletivo do B<sub>2</sub>R, Hoe 140 (1, 10 ou 50 pmol/camundongo; i.c.v.) (Hoechst, Alemanha). As soluções estoque foram diluídas com PBS, preparadas em tubos plásticos siliconizados, armazenados a -20 °C e diluídas na concentração desejada no dia dos experimentos, sendo mantidas em gelo durante a realização dos experimentos. Grupos tratados com PBS foram utilizados como controle.

### ***Teste do campo aberto***

Para avaliar possíveis alterações locomotoras induzidas pelos diferentes tratamentos utilizados 8 dias após o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub>, os animais foram testados durante 5 min no campo aberto. O aparato, feito de madeira e fórmica, é formado por um chão de cor preta (30 x 30 cm), dividido em 9 quadrantes de 10 x 10 cm, com paredes transparentes de 15 cm de altura. Durante os experimentos, cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e as sessões experimentais foram gravadas por um sistema de câmera de vídeo. O número de quadrantes cruzados e de *rearings* (ato de levantar) foi registrado e tomado como índice de atividade motora.

### ***Labirinto Aquático de Morris***

Os efeitos da administração i.c.v. dos fragmentos amilóides sobre a memória espacial de camundongos foram avaliados através do teste do labirinto aquático (Morris et al., 1982). O labirinto aquático consiste de um tanque circular de cor preta (97 cm de diâmetro e 60 cm de altura), estando localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas

paredes. O tanque foi preenchido com água, sendo a temperatura da água mantida ( $25 \pm 2$  °C) através de um sistema automatizado de resistência. Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiram a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). No interior do tanque (posição sudoeste) foi colocada uma plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm), submersa 1 a 1,5 cm da superfície da água.

O protocolo experimental consistiu em uma sessão de treino e uma sessão de teste. Durante o treinamento (7 ou 30 dias após tratamento com  $A\beta_{1-40}$ ), os animais foram liberados para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era conduzido manualmente até esta, onde permanecia por 10 s. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma, a velocidade de nado e a distância percorrida foram registrados. Após os 10 s, o animal era retirado do labirinto e colocado em uma caixa por 20 s, sendo então posicionado no ponto de partida seguinte. Este procedimento foi realizado 10 vezes na sessão de treino, sendo que os animais foram liberados para nadar de pontos de partida diferentes de forma pseudo-aleatória e a plataforma permaneceu na mesma posição (quadrante Sudeste). Na sessão de teste, realizada 24 h após a sessão de treinamento (8 ou 31 dias após tratamento com  $A\beta_{1-40}$ ), os animais foram novamente liberados para nadar a partir da posição Norte, no entanto, a plataforma foi removida do labirinto. O tempo de nado gasto pelos animais

no quadrante onde se encontrava a plataforma na sessão de treino (no dia anterior) foi utilizado como índice de memória.

### ***Preparo dos cortes histológicos e reativação antigênica***

A análise de imunohistoquímica foi realizada 1 e 8 dias após o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> em cérebros de camundongos. Para tal os cérebros dos animais foram coletados após processo de perfusão com solução salina e paraformaldeído 4 %. O emblocamento, coloração (vermelho congo e cresil-violeta) e corte das lâminas foram realizados externamente, por empresa terceirizada (IDAP - Florianópolis). Os cortes teciduais de espessura de 3  $\mu$ m foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich) a 5 % em acetona PA, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50 °C durante 1 h para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinados em cubas de vidro contendo xilol e re-hidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90 %, 80 % e 70 %). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 % e metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem com água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de

ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). Após preparo da solução, as lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95 – 98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em PBS.

### ***Detecção imunológica***

A imunodeteção foi realizada utilizando marcadores do processo de apoptose, anti-caspase-3 (1:200; Cell Signaling Technology, MA, EUA), de astrócito ativado, anti-GFAP (proteína glial fibrilar ácida) (1:300; Dako Cytomation, CA, EUA) e da proteína pré-sináptica sinaptofisina, anti-sinaptofisina (1:400; Novocastra, Newcastle, Reino Unido). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2 – 8 °C, durante 12 – 16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de peroxidase (En Vision Plus; Dako Cytomation) em câmara úmida durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS por 5 min, em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial (Dako Cytomation), através de

uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride) previamente diluído em tampão imidazol (pH 7,2) e peróxido de hidrogênio a 0,3 %. Após a revelação, foram realizadas a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, 80 %, 90 % e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Entellan (Merck, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo na ausência do anticorpo primário nas reações. Os resultados foram obtidos através de microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i) e câmera digital (DS-5M-L1; Nikon, NY, USA), acoplados. Imagens digitalizadas foram transferidas para o computador e a intensidade média de marcação foi determinada para a proteína sinaptofisina através do programa *NIH ImageJ 1.36b* (National Institutes of Health, Maryland, EUA). O efeito do tratamento i.c.v. com A $\beta$ <sub>1-40</sub> sobre a detecção da sinaptofisina foi avaliado nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, bem como no córtex parietal. A metodologia para avaliar a degeneração sináptica através do nível de sinaptofisina foi previamente validada em modelos experimentais de neurodegeneração (Buttini et al., 1999) e em cérebros de humanos acometidos por doenças degenerativas (Masliah et al., 1992). A contagem de células positivas para GFAP ou caspase-3 foi realizada através de análise microscópica nas mesmas áreas avaliadas para sinaptofisina, sendo os resultados expressos através do número de células positivas no aumento de 400 x.

### ***Coleta dos tecidos***

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações moleculares após diferentes intervalos da administração dos fragmentos amilóides, alguns animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9 %) gelada (4 °C). Imediatamente após, o cérebro foi dissecado sobre uma placa de Petri rodeada por pedras de gelo seco, formando assim um microambiente gelado. O córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados, pesados e em seguida armazenados em freezer a -70 °C, até o momento do uso.

### ***Determinação de marcadores do estresse oxidativo***

Com o objetivo de verificar possíveis alterações em parâmetros oxidativos em consequência da administração i.c.v. da A $\beta$ <sub>1-40</sub>, foram medidos os níveis de glutathiona total (GSH total) e a atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). As estruturas cerebrais (hipocampo e córtex pré-frontal) foram homogeneizadas em tampão HEPES 20 mM (pH 7,4). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 20.000 x g por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4° C). O sobrenadante foi então separado e conservado em freezer a -70 °C para posterior dosagem das atividades enzimáticas. Para as dosagens do conteúdo de GSH total, os tecidos foram homogeneizados em ácido perclórico (PCA) 0,5 M e, em seguida, centrifugados a 15.000 x g por 2 min (4° C). O sobrenadante foi separado e neutralizado (diluição 10 x) em tampão fosfato (KPI 0,1 M – pH 7,4).

### ***Medida dos níveis de glutathiona total (GSH total)***

O método utilizado foi originalmente descrito por Tietze (1969) e posteriormente modificado por Akerboom e Sies (1981). Consiste em um método enzimático cíclico que detecta tanto a forma oxidada (GSSG) quanto a forma reduzida (GSH) da glutathiona, o que então é definido como glutathiona total (GSH total). O reagente de Ellman, DTNB, reage espontaneamente com GSH formando o ânion colorido TNB e o conjugado GS-TNB, incolor. A glutathiona redutase (GR) cliva este conjugado e utiliza NADPH como co-fator, produzindo GSH e TNB, desenvolvendo mais cor. A GSH reage novamente com DTNB reiniciando o ciclo. Caso haja presença de GSSG, esta é primeiramente reduzida a GSH pela ação da enzima GR e, em seguida, entra no ciclo. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 412 nm, por 1 – 4 min. Neste ensaio, o meio de reação consistia de tampão fosfato de potássio 0,1 M, contendo EDTA 1 mM, DTNB 0,1 mM e NADPH 0,2 mM. Após a adição da amostra ou do padrão, iniciava-se a reação pela adição da GR 0,2 U/ml. A concentração de GSH total foi obtida pela comparação das absorbâncias das amostras com a absorbância de uma curva padrão de GSSG (0,1-1,0 nmol/ml). A reação basal, sem a presença de GSSG ou amostra, foi descontada do delta de absorbância por minuto obtido na presença do padrão ou da amostra. O valor obtido foi multiplicado pelas diluições.

### ***Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx)***

A GPx catalisa a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bem como de outros lipodroperóxidos, utilizando a glutationa reduzida (GSH) como substrato para esta reação e produzindo glutationa oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutationa redutase com o consumo de NADPH, que pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm (Wendel, 1981; Flohé e Günzler, 1984). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), EDTA 1 mM, GSH 1 mM e NADPH 0,1 mM. A amostra foi adicionada a esse meio para medir o consumo inespecífico de NADPH através de uma leitura, por 2 – 4 min, a 340 nm. Do decréscimo de absorbância (340 nm) por minuto obtido foi descontado o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar de NADPH ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a  $1 \mu\text{mol}/\text{min}$ .

### ***Atividade da enzima glutationa redutase (GR)***

A GR catalisa a redução da glutationa oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Calberg e Mannervik, 1985). O meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), EDTA 1 mM e NADPH 0,2 mM. Após adicionar a amostra, o consumo inespecífico de

NADPH foi avaliado por 2 – 4 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato GSSG 1 mM a leitura foi realizada por 2 – 4 min adicionais. Do valor de decaimento por minuto obtido foi descontado o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar de NADPH ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

### ***Extração de RNA total***

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos em 1 ml de reagente TRIzol® (Invitrogen, SP, Brazil). Foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de clorofórmio ao homogenato, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (14.000 rpm, 15 min, 4 °C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi centrifugada (14.000 rpm, 15 min, 4 °C), sendo o pellet resultante re-suspenso em 1 ml de etanol gelado. Após centrifugação (10.000 rpm, 5 min, 4 °C), o pellet contendo RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1 % de dietilpirocarbonato (DEPC), sendo a concentração e a pureza determinadas em espectrofotômetro pela absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ) e pela razão das absorvâncias  $A_{260}/A_{280}$ , respectivamente. O RNA foi aliquotado e estocado em freezer a -70 °C até o momento do uso.

### ***Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase***

A fim de determinar o efeito da administração i.c.v. da proteína A $\beta$ <sub>1-40</sub> sobre a expressão do RNAm para o TNF $\alpha$  e iNOS, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para a reação da transcrição reversa, foi utilizada a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) (Invitrogen). Amostras contendo 2  $\mu$ g de RNA total foram incubadas em um volume final de 12,5  $\mu$ l de reação constituído de tampão de primeira fita (Tris-HCl 50 mM – pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM), 8 mM de DTT, 0,5  $\mu$ g de oligo dT *primer*, 2 U de inibidor de RNase, 144  $\mu$ M de dNTPs, 50 U da enzima e água-DEPC para completar o volume. Para a obtenção do DNA complementar (DNAc) as amostras foram aquecidas por 5 min a 70 °C, resfriadas a 4 °C por 5 min e mantidas a 25 °C durante a adição da enzima M-MLV. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 60 min, 70 °C por 5 min e resfriadas a 4 °C por 5 min. A concentração do DNAc de cada amostra foi determinada por espectrofotômetro (A260).

Foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase para promover a amplificação do DNAc para o TNF $\alpha$ , iNOS e  $\beta$ -actina. Para tal, os produtos de DNAc obtidos pela técnica de RT foram amplificados com a enzima Taq DNA polimerase (5 U) na presença de 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de dNTPs e 300 nM dos *primers* específicos para o TNF $\alpha$  (sense, TCTCATCAGTTCTATGGCCC; antisense, GGGAGTAGACAAGGTACAAC), iNOS (sense, CAGAAGCAGAATGTGACCATC; antisense, CTCTGGTCGATGTCATGA) ou  $\beta$ -actina (sense, TCCTTCGTTGCCGGTCCACA;

antisense, CGTCTCCGGAGTCCATCACA) de camundongos. O PCR para  $\beta$ -actina foi utilizado como controle para confirmar a proporção na quantidade de RNA e DNAc nos experimentos. Quatro minutos após o pré-aquecimento a temperatura de 95 °C, a mistura foi amplificada com 29 ciclos começando com um derretimento a 95 °C por 30 s, anelamento a 53 °C por 30 s (TNF $\alpha$  e iNOS) ou 62 °C por 30 s ( $\beta$ -actina), seguido por extensão a 72 °C por 1 min. A extensão final foi realizada por 5 min a 72 °C. Os produtos finais do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida corado com sais de prata. Os géis foram digitalizados e analisados utilizando o programa *NIH ImageJ 1.36b* (National Institutes of Health).

### ***Preparação das frações de proteínas celulares para imunodeteção de proteínas***

As amostras de hipocampo e córtex pré-frontal coletadas foram homogeneizadas com processador de tecidos (*Tissue tearor*, Biospec Products, INC., OK, EUA) em tampão de lise A gelado [Tampão A: HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1,5  $\mu$ g/ml de inibidor de tripsina, 7  $\mu$ g/ml de pepstatina A, 5  $\mu$ g/ml de leupeptina e 10  $\mu$ g/ml de aprotinina], incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 14.000 rpm, 60 min, 4 °C. O sobrenadante foi coletado como extrato citoplasmático. Para obtenção das proteínas de membrana o homogenato foi re-suspenso em tampão de lise A contendo 1 % de Triton-X

100, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm, 30 min, 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado como extrato rico em membrana.

Para obtenção das proteínas nucleares o hipocampo e o córtex pré-frontal foram homogeneizados em tampão HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1,5 µg/ml de inibidor de tripsina, 7 µg/ml de pepstatina A, 5 µg/ml de leupeptina e 10 µg/ml de aprotinina. Posteriormente os homogenatos foram incubados em gelo por 15 min e centrifugadas a 14.000 rpm, 60 min, 4 °C. O precipitado obtido foi lavado três vezes com solução salina gelada e re-suspenso em tampão HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 420 mM de NaCl; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de EDTA; 0,1 de EGTA; 25% v/v de glicerol, 0,5 mM de PMSF, 0,5 mM de DTT, 1,5 µg/ml de inibidor de tripsina, 7 µg/ml de pepstatina A, 5 µg/ml de leupeptina e 10 µg/ml de aprotinina). O homogenato foi centrifugado a 14.000 rpm, 10 min, 4 °C para remover os debris. O sobrenadante foi coletado como extrato nuclear.

A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando o kit Bio-Rad para determinação de proteínas (Bio-Rad *Protein Assay Kit*) segundo recomendações do fabricante. As frações celulares foram armazenadas em freezer a -70 °C até o momento do uso.

### ***Ensaio de imunodeteção ("western blot")***

Proteínas previamente fracionadas foram misturadas com tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, contendo: β-

mercaptoetanol 15 %, SDS 6 %, azul de bromofenol 0,3 %), fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (8 – 15 %). Em seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de polivinilidenodifluorido (PVDF). A transferência foi efetuada em 2 h a 200 mA em tampão Tris-base 48 mM (pH 8,4), glicina 39 mM, SDS 0,037 % e metanol 20 %. As membranas de PVDF foram saturadas em solução de TBS-T contendo leite desnatado (5 %) por 2 – 4 h, a temperatura ambiente, mantidas nesta temperatura e então incubadas por intervalos de tempo apropriados com anticorpos primários para as proteínas de interesse: p65NF- $\kappa$ B (sc-372, 1:1000), c-jun (sc-45, 1:1000), iNOS (sc-7271, 1:200),  $\alpha$ -actina (sc-1615, 1:2000), JNK1 (sc-571, 1:1000), fosfo-JNK (sc-6254, 1:1000), B<sub>1</sub>R (sc-25484, 1:200), B<sub>2</sub>R (sc-15050, 1:200) (Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA) ou laminina A/C (#2032) (Cell Signaling Technology). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase ou fosfatase alcalina e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL; GE Healthcare, SP, Brasil) e filme radiográfico ou kit BCIP/NBT (Promega, WI, EUA), segundo recomendações do fabricante. Os produtos finais foram digitalizados e analisados utilizando o programa *NIH ImageJ 1.36b* (National Institutes of Health).

### ***Análise estatística***

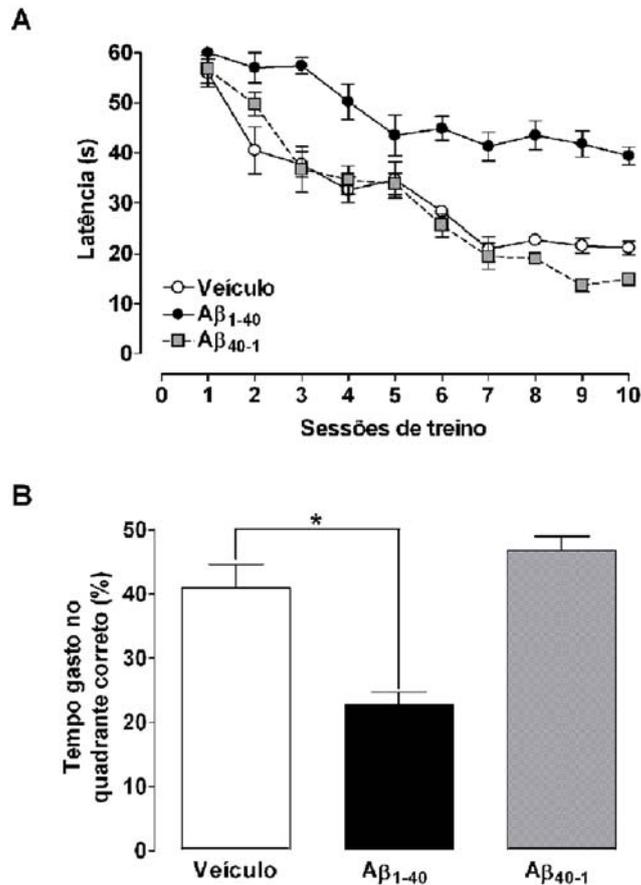
Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da

análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi  $P < 0,05$ . Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico *Statistica* (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## RESULTADOS

### *Caracterização do efeito da administração intracerebroventricular dos peptídeos $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{40-1}$ no aprendizado e memória espacial de camundongos*

As funções de aprendizado e memória são vulneráveis a várias patologias, incluindo a doença de Alzheimer (Budson & Price, 2005). No presente estudo foi avaliada a capacidade de aquisição (sessão de treino, 7 dias após a injeção i.c.v. de  $A\beta$ , com plataforma) e retenção (sessão de teste, 1 dia após o treino, sem plataforma) dos animais frente a informação espacial obtida no labirinto aquático de Morris. Como esperado, a administração i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo) em camundongos *Swiss* resultou em declínio na função cognitiva, como demonstrado pelas altas latências para encontrar a plataforma na sessão de treino (Fig. 1A) e pela redução na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste (Fig. 1B), em relação aos animais controle (veículo, i.c.v.). Nenhuma alteração, em relação ao controle, foi verificada em animais que receberam a injeção i.c.v. do fragmento amilóide inverso ( $A\beta_{40-1}$ , 400 pmol/camundongo). Os efeitos da  $A\beta_{1-40}$  no desempenho dos camundongos no labirinto aquático não parecem estar associados a alterações da atividade locomotora dos animais, uma vez que este tratamento não interferiu com os parâmetros comportamentais de exploração (cruzamentos e *rearings*) no teste do campo aberto (Tabela 1). Em conjunto, estes resultados indicam que a administração i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  é capaz de prejudicar a memória espacial de camundongos no labirinto aquático.



*Figura 1 – Efeitos de uma única injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) ou do peptídeo inverso Aβ<sub>40-1</sub> (400 pmol/camundongo) no aprendizado e memória espacial de camundongos Swiss. Os animais foram treinados e testados no labirinto aquático de Morris, respectivamente, 7 e 8 dias após a injeção i.c.v. dos fragmentos amilóides ou da solução controle (veículo, PBS). (A) Tratamento com a Aβ<sub>1-40</sub>, mas não com a Aβ<sub>40-1</sub>, aumentou significativamente a latência para encontrar a plataforma submersa durante a sessão e treino [ $F_{2,26} = 104,32$ ;  $P < 0,0001$ ]. (B) O tratamento com a Aβ<sub>1-40</sub>, mas não com a Aβ<sub>40-1</sub>, reduziu o percentual do tempo gasto pelos animais no quadrante correto durante a sessão de teste (onde se encontrava a plataforma nas sessões de treino) [ $F_{2,26} = 19,91$ ;  $P < 0,0001$ ]. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo.*

<i>Tratamento</i>	<i>Cruzamentos</i>	<i>Levantar</i>
<b>Veículo</b>	78,0 ± 4,6	32,5 ± 2,9
<b>Aβ<sub>1-40</sub></b>	78,6 ± 4,3	34,3 ± 3,2
<b>Aβ<sub>40-1</sub></b>	75,7 ± 2,4	27,3 ± 1,9

*Tabela 1 - Efeitos da administração intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo), do peptídeo inverso Aβ<sub>40-1</sub> (400 pmol/camundongo) ou da solução controle (veículo, PBS) (8 dias antes dos experimentos) nos parâmetros comportamentais de camundongos Swiss testados no campo aberto (por 5 min). Os tratamentos com os fragmentos amilóides não alteraram os parâmetros comportamentais de exploração no teste do campo aberto: cruzamentos [ $F_{2,26} = 0,14$ ;  $P = 0,86$ ]; rearings [ $F_{2,26} = 1,49$ ;  $P = 0,24$ ]. Os valores estão expressos como a média ± e.p.m.*

#### ***Papel do TNF-α no dano cognitivo induzido pela Aβ<sub>1-40</sub>***

Para verificar a participação do TNF-α no dano cognitivo induzido pela Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo, i.c.v.) foram utilizadas ferramentas farmacológicas e genéticas. Inicialmente, camundongos *Swiss* foram tratados 15 min antes da injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> com o anticorpo específico contra o TNF-α de camundongo (AbTNF-α, 10 ηg/camundongo, i.c.v.). A figura 2 mostra que o tratamento com o AbTNF-α preveniu de forma significativa o dano sobre a memória espacial induzido pela Aβ<sub>1-40</sub>, como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma na sessão

de treino, em comparação ao grupo que recebeu  $A\beta_{1-40}$ /PBS (Fig. 2A). Além disso, a análise dos dados obtidos na sessão de teste indicam que o AbTNF- $\alpha$  foi capaz de reduzir o prejuízo cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ , como demonstrado pelo aumento na preferência pelo quadrante correto em relação aos animais tratados com  $A\beta_{1-40}$ /PBS (Fig. 2B).

Em uma segunda abordagem, animais com ausência do gene para o TNFR1 (*TNFR1*<sup>-/-</sup>) foram tratados com a  $A\beta_{1-40}$  e submetidos ao teste do labirinto aquático. Os animais *TNFR1*<sup>-/-</sup> apresentaram uma atenuação no declínio de memória induzido pela  $A\beta_{1-40}$ , como verificado pela menor latência para encontrar a plataforma em comparação aos animais da linhagem controle (*C57Bl/6*, +/+), quando tratados com  $A\beta_{1-40}$  (Fig. 2C). Durante a sessão de teste, os animais *TNFR1*<sup>-/-</sup> tratados com  $A\beta_{1-40}$  apresentaram maiores índices de preferência pelo quadrante correto em comparação aos animais *C57Bl/6* (+/+) tratados com  $A\beta_{1-40}$  (Fig. 2D), indicando menor sensibilidade destes animais ao dano cognitivo induzido pela  $A\beta_{1-40}$ .

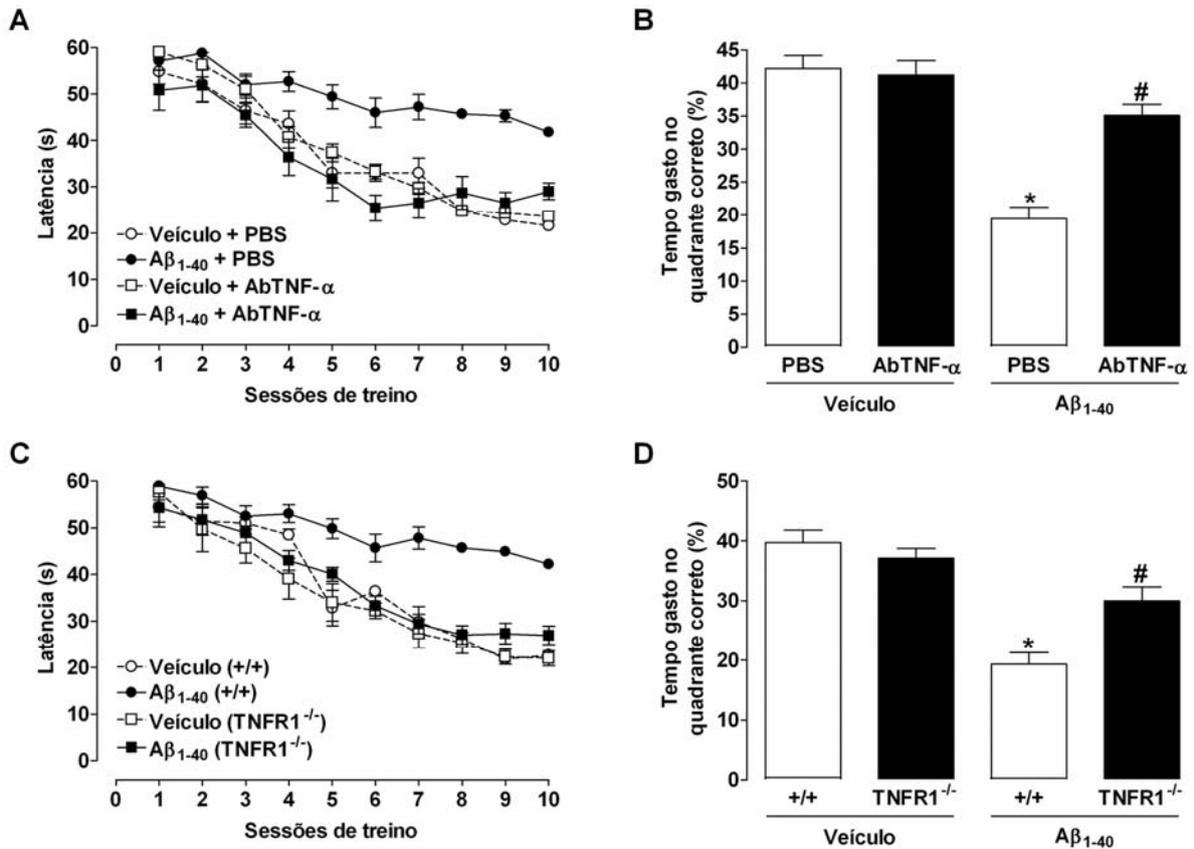
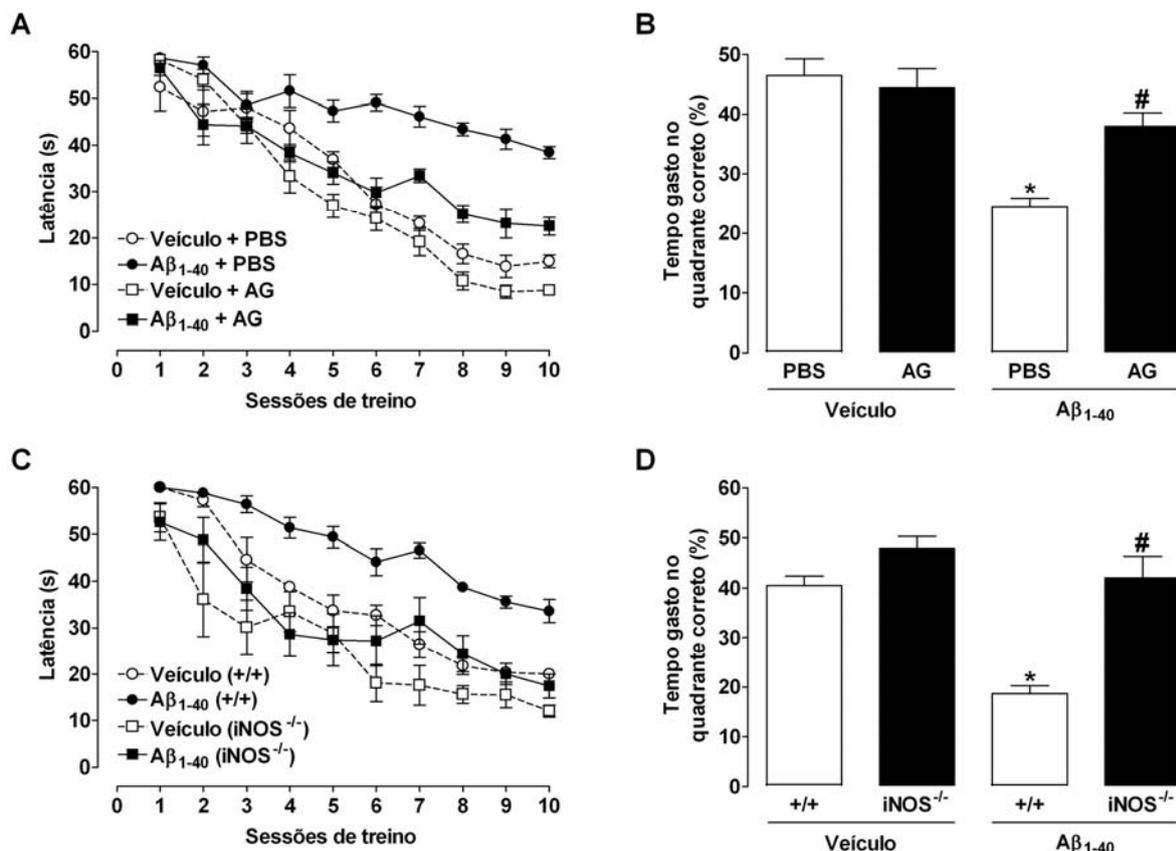


Figura 2 – Envolvimento do  $TNF-\alpha$  no dano cognitivo induzido pela injeção *i.c.v.* de  $A\beta_{1-40}$ . (A,B) O pré-tratamento com o anticorpo específico contra o  $TNF-\alpha$  de camundongo ( $AbTNF-\alpha$ , 10  $\eta g$ /camundongo, *i.c.v.*) ou (C,D) a deleção gênica do  $TNFR1$  ( $TNFR1^{-/-}$ ) diminuíram o declínio de memória espacial induzido pela  $A\beta_{1-40}$  (400  $pmol$ /camundongo), como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma na sessão de treino [ $AbTNF-\alpha$ :  $F_{1,27} = 21,89$ ;  $P < 0,0001$  -  $TNFR1^{-/-}$ :  $F_{1,30} = 29,58$ ;  $P < 0,0001$ ] e pelo aumento na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste [ $AbTNF-\alpha$ :  $F_{1,27} = 5,26$ ;  $P < 0,05$  -  $TNFR1^{-/-}$ :  $F_{1,30} = 15,45$ ;  $P < 0,001$ ] quando comparados ao grupo que recebeu  $A\beta_{1-40}$ . Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/PBS ou veículo/(+/+). # $P < 0,05$  comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ /PBS ou  $A\beta_{1-40}$ /(+/+).

### ***Papel da iNOS no dano cognitivo induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>***

De maneira similar ao TNF- $\alpha$ , a participação da enzima iNOS no dano cognitivo induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) foi avaliada através de abordagens farmacológica, através do uso do inibidor preferencial para iNOS aminoguanidina (AG, 100 mg/kg, i.p.) e, genética, através do uso de animais com ausência no gene para a iNOS (*iNOS*<sup>-/-</sup>). O tratamento com a AG foi realizado em camundongos *Swiss* 1 h antes da injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> e 1 x ao dia até o dia do teste. Como demonstrado na figura 3, tanto o tratamento com a AG quanto a ausência no gene para a iNOS preveniram de forma significativa o dano sobre a memória espacial induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>, como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma na sessão de treino quando comparado ao grupo controle, A $\beta$ <sub>1-40</sub>/PBS e A $\beta$ <sub>1-40</sub>/(+/+), respectivamente (Fig. 3A,C). Além disso, a análise dos dados obtidos na sessão de teste indica que os animais tratados com a AG e os animais *iNOS*<sup>-/-</sup> são resistentes ao prejuízo cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>, como revelam os dados que mostram um aumento na preferência pelo quadrante correto em relação aos respectivos controles (Fig. 3B,D).

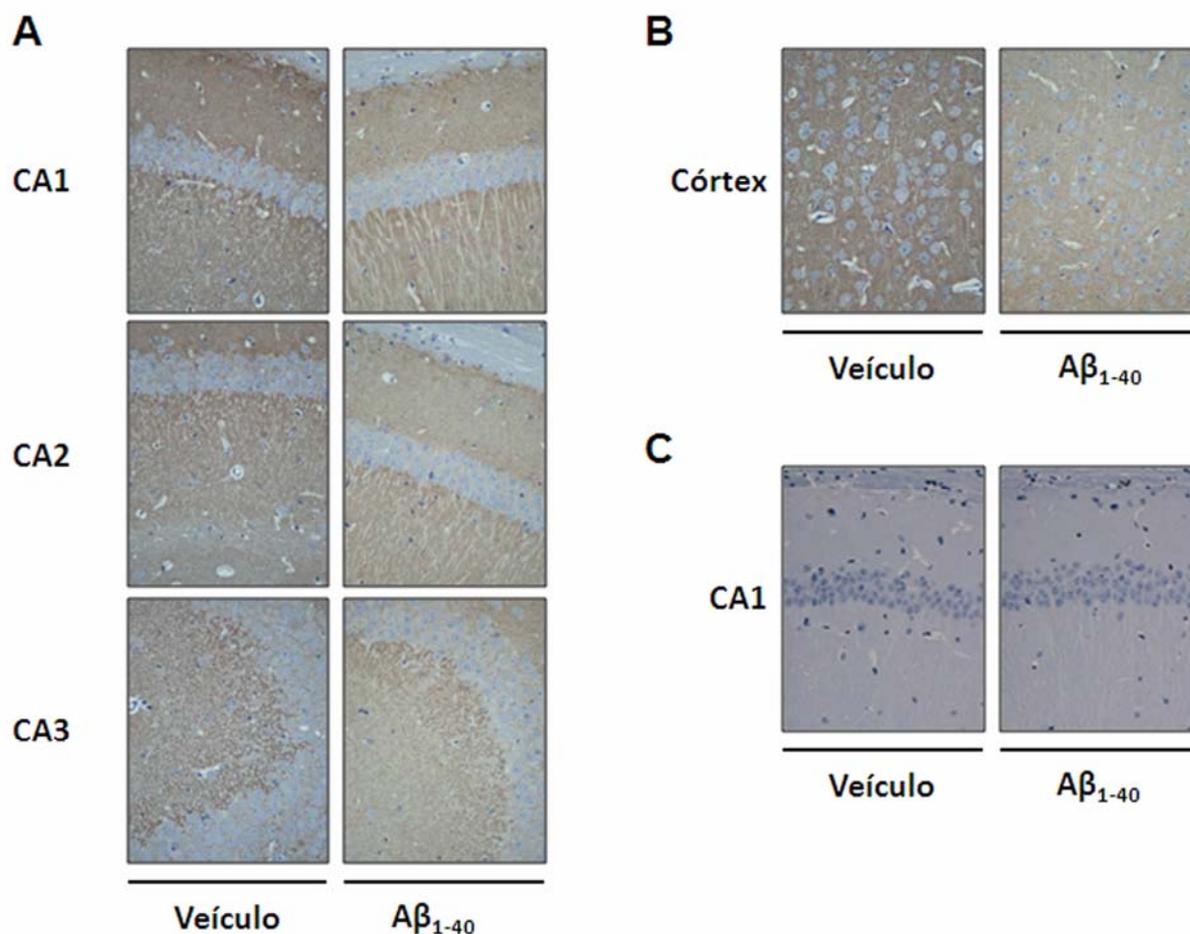


**Figura 3 – Envolvimento da iNOS no dano cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub>.** (A,B) O pré-tratamento com o inibidor preferencial para iNOS aminoguanidina (AG, 100 mg/kg, i.p., 1 x ao dia) ou (C,D) a deleção gênica da *iNOS* (*iNOS*<sup>-/-</sup>) reduzem o declínio de memória espacial induzido pela Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo), como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma na sessão de treino [AG:  $F_{1,33} = 82,78$ ;  $P < 0,0001$  - *iNOS*<sup>-/-</sup>:  $F_{1,26} = 81,46$ ;  $P < 0,0001$ ] e pelo aumento na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste [AG:  $F_{1,33} = 29,14$ ;  $P < 0,0001$  - *iNOS*<sup>-/-</sup>:  $F_{1,26} = 28,46$ ;  $P < 0,0001$ ] quando comparados ao grupo que recebeu Aβ<sub>1-40</sub>. Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/PBS ou veículo/(+/+). # $P < 0,05$  comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>/PBS ou Aβ<sub>1-40</sub>/(+/+).

### *Participação do TNF- $\alpha$ e iNOS na disfunção sináptica induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>*

Para avaliar a possível formação de depósitos amilóides e/ou dano neuronal foi realizada a análise histológica nos cérebros dos camundongos 8 dias após o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) através das técnicas de coloração por vermelho congo e cresil-violeta, respectivamente. Tanto os cérebros obtidos de animais controles, quanto aqueles obtidos de animais tratados com A $\beta$ <sub>1-40</sub> não apresentaram qualquer evidência de formação de depósitos amilóides (resultados não mostrados). Além disso, a análise dos dados obtidos através da coloração com cresil-violeta indicam que tanto a injeção i.c.v. de solução veículo quanto de A $\beta$ <sub>1-40</sub> não foram capazes de promover morte neuronal em diferentes áreas do cérebro, incluindo o hipocampo e o córtex pré-frontal (resultados não mostrados).

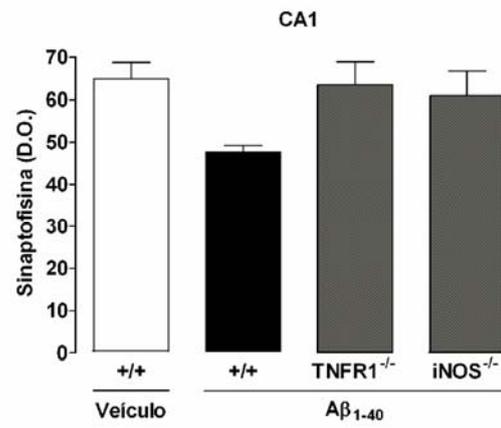
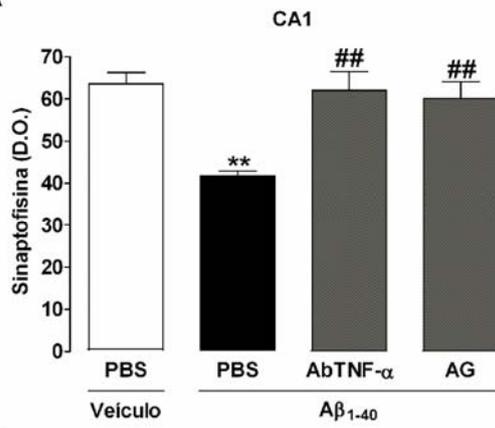
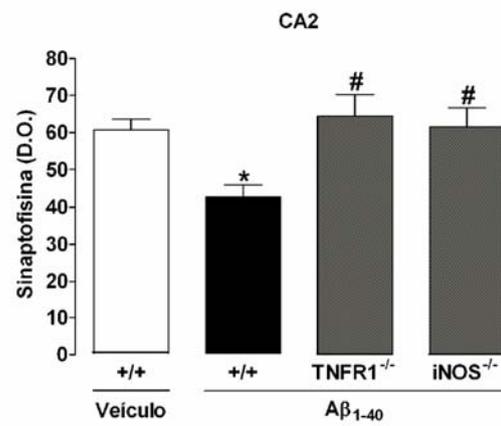
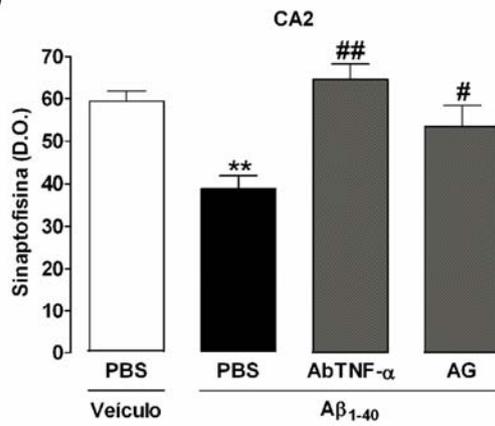
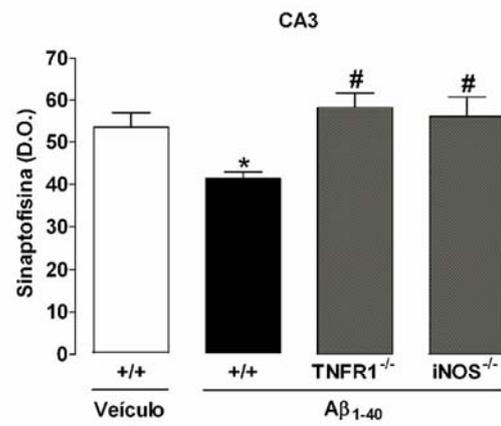
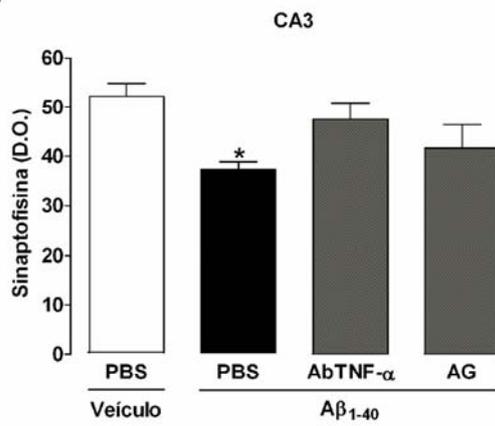
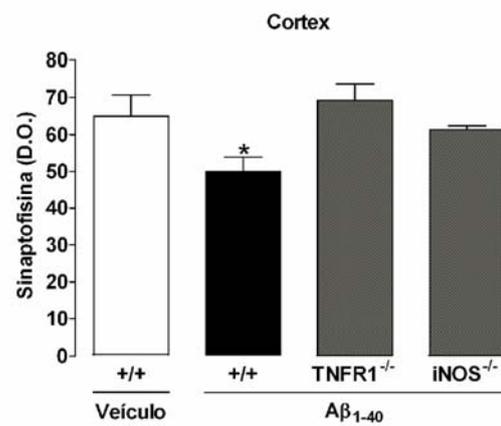
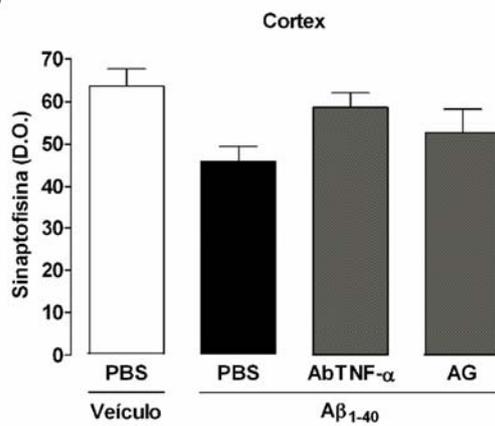
A fim de confirmar a integridade neuronal 8 dias após a administração de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) a expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina e da proteína pró-apoptótica caspase-3 foram analisadas pela técnica de imunohistoquímica. Como demonstrado na figura 4, o nível de detecção da proteína sinaptofisina foi menor nas subregiões hipocampais CA1, CA2 e CA3 e no córtex parietal dos animais tratados com A $\beta$ <sub>1-40</sub>, em relação aos animais tratados com veículo (PBS). Esses dados sugerem um processo de disfunção sináptica induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Por outro lado, nessas mesmas regiões cerebrais não foi observada detecção da proteína caspase-3, confirmando que, pelo menos até 8 dias após a injeção i.c.v., o processo de morte celular não foi ativado pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> (Fig. 4C).



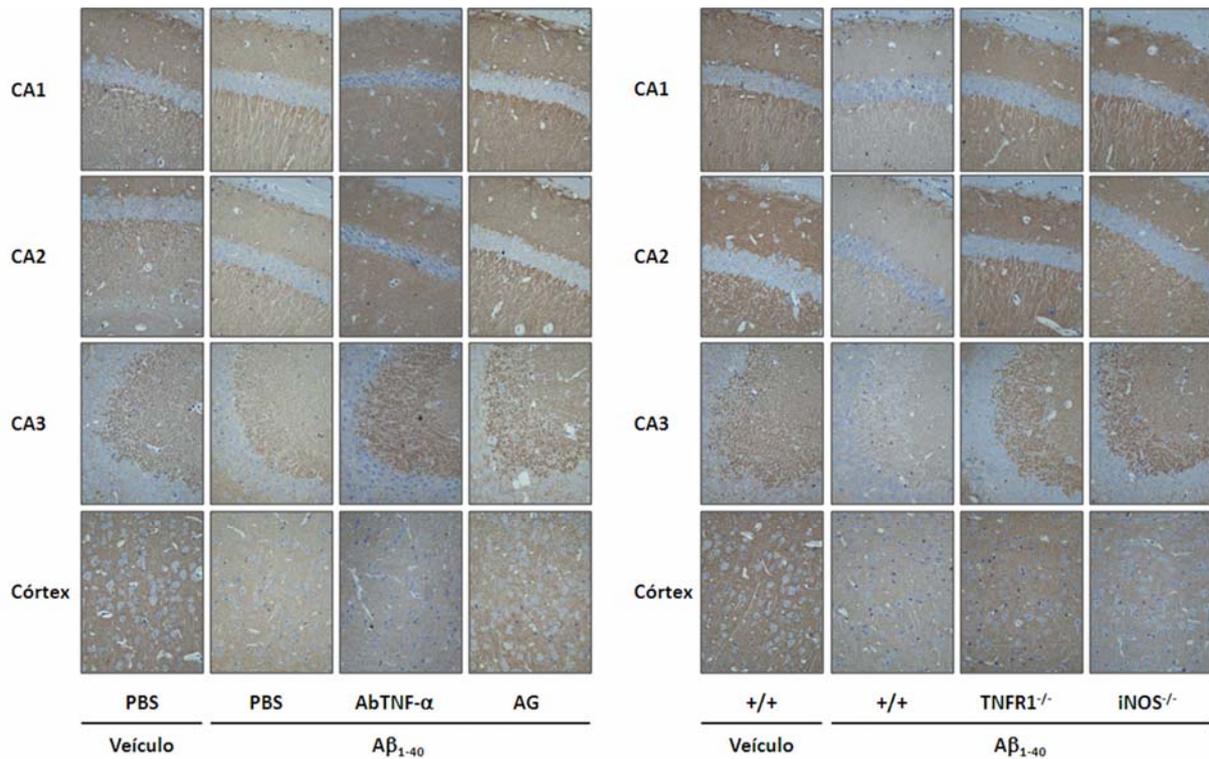
**Figura 4 – A disfunção sináptica precede a morte neuronal após o tratamento com Aβ<sub>1-40</sub>.** A análise por imunohistoquímica foi realizada 8 dias após a administração i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo). Figuras representativas da imunodeteccção para a proteína pré-sináptica sinaptofisina realizada (A) nas subregiões hipocâmpais CA1, CA2 e CA3 e (B) no córtex parietal, como medida de densidade sináptica. (C) Ausência de marcação para a proteína pró-apoptótica caspase-3 na subregião hipocâmpal CA1.

Posteriormente, foi avaliada a possível participação das proteínas TNF- $\alpha$  e iNOS no dano sináptico induzido pela Aβ<sub>1-40</sub>. Como demonstrado nas figuras 5 e 6, o tratamento farmacológico com o AbTNF- $\alpha$  (10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) ou com a AG (100 mg/kg, i.p., 1 x ao dia), preveniu

a redução dos níveis de sinaptofisina induzido pela  $A\beta_{1-40}$ , tanto na região hipocampal quanto cortical. Consistente com estes dados, resultados similares foram obtidos em animais *TNFR1<sup>-/-</sup>* e *iNOS<sup>-/-</sup>*, quando comparados aos animais da linhagem selvagem (*C57Bl/6, +/+*). Em conjunto, estes resultados confirmam e estendem dados prévios da literatura (Selkoe, 2002), sugerindo que a disfunção sináptica precede a morte neuronal em cérebros com a doença de Alzheimer, através de um processo dependente das proteínas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e iNOS.

**A****B****C****D**

*Figura 5 – O TNF- $\alpha$  e a iNOS participam da disfunção sináptica induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. A análise por imunohistoquímica foi realizada 8 dias após a administração i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo). A medida da densidade óptica nas amostras imunoreativas para sinaptofisina foi realizada nas subregiões hipocâmpais (A) CA1, (B) CA2 e (C) CA3, e (D) no córtex parietal. A detecção da proteína sinaptofisina foi usada como medida de densidade sináptica. (Painel esquerdo) O pré-tratamento com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) ou com o inibidor preferencial para iNOS aminoguanidina (AG, 100 mg/kg, i.p., 1 x ao dia), preveniu a redução dos níveis de sinaptofisina induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos *Swiss* na CA1 [ $F_{3,8} = 9,38$ ;  $P < 0,01$ ] e CA2 [ $F_{3,8} = 9,44$ ;  $P < 0,01$ ], mas não na CA3 [ $F_{3,8} = 4,02$ ;  $P = 0,06$ ] e córtex parietal [ $F_{3,8} = 3,26$ ;  $P = 0,08$ ]. (Painel direito) A deleção gênica do *TNFR1* (*TNFR1*<sup>-/-</sup>) ou da *iNOS* (*iNOS*<sup>-/-</sup>) reduz significativamente a disfunção sináptica induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> em comparação aos animais de linhagem *C57Bl/6* (+/+) na CA2 [ $F_{3,8} = 4,79$ ;  $P < 0,05$ ] e CA3 [ $F_{3,8} = 4,63$ ;  $P < 0,05$ ], mas não na CA1 [ $F_{3,8} = 3,17$ ;  $P = 0,08$ ] e córtex parietal [ $F_{3,8} = 4,00$ ;  $P < 0,05$ ]. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo veículo/PBS ou veículo/(+/+). # $P < 0,05$  e ## $P < 0,01$  comparado ao grupo A $\beta$ <sub>1-40</sub>/PBS ou A $\beta$ <sub>1-40</sub>/(+/+).*



**Figura 6 – Figuras representativas da reação de imunohistoquímica para a proteína pré-sináptica sinaptofisina analisada nas subregiões hipocâmpais CA1, CA2 e CA3, e no córtex parietal como medida de densidade sináptica.** (Painel esquerdo) O pré-tratamento com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) ou com o inibidor preferencial para iNOS aminoguanidina (AG, 100 mg/kg, i.p., 1 x ao dia), preveniu a redução dos níveis de sinaptofisina induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos *Swiss*. (Painel direito) A deleção gênica do *TNFR1* (*TNFR1*<sup>-/-</sup>) ou da *iNOS* (*iNOS*<sup>-/-</sup>) reduz significativamente a disfunção sináptica induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> em comparação aos animais de linhagem *C57Bl/6* (+/+).

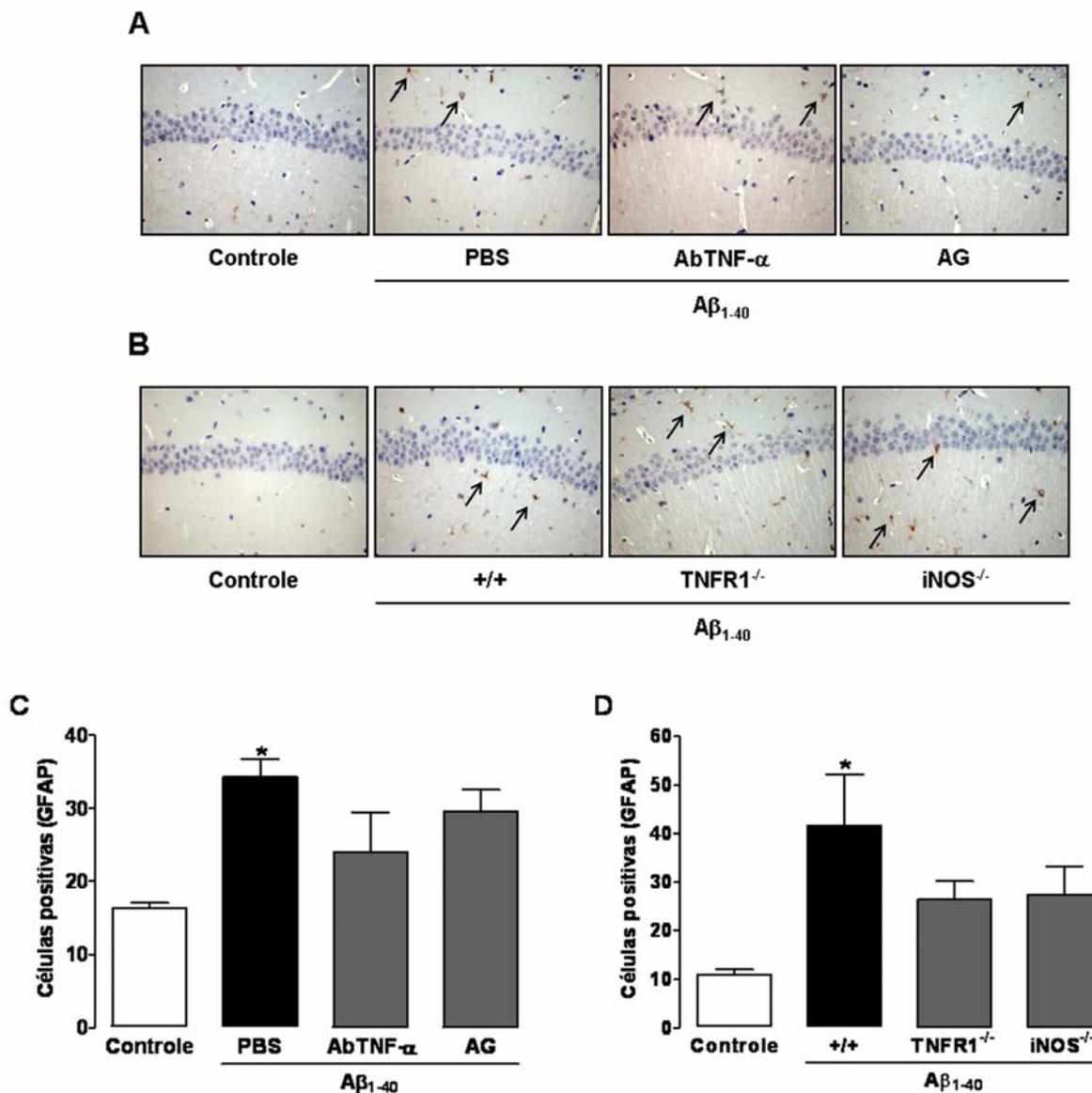
### ***A $\beta$ <sub>1-40</sub> induz ativação de astrócitos***

A ativação dos astrócitos é considerada um dos primeiros sinais da doença de Alzheimer e ocorre em resposta ao aumento na degeneração das sinapses e neurônios ou pelo acúmulo de placas amilóides no cérebro. No presente estudo, foi avaliada ativação dos astrócitos um e 8 dias após o

tratamento com a  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo) através da imunodeteção da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) pela técnica de imunohistoquímica. Cérebros obtidos de animais tratados com veículo (PBS, controle) apresentaram baixa marcação para GFAP nas regiões hipocampal e cortical. Por outro lado, a administração de  $A\beta_{1-40}$  resultou em aumento significativo na imunoreatividade para GFAP no hipocampo (Fig. 7), mas não no córtex, 1 dia após o tratamento. Oito dias após o tratamento não havia diferença entre os grupos controle e  $A\beta_{1-40}$  quanto à detecção da proteína GFAP (resultado não mostrado).

O possível envolvimento do  $TNF-\alpha$  e da iNOS no processo de ativação dos astrócitos pela  $A\beta_{1-40}$  também foi avaliado. Os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento com o anticorpo específico contra o  $TNF-\alpha$  de camundongo (Ab $TNF-\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) ou com o inibidor preferencial para iNOS aminoguanidina (AG, 100 mg/kg, i.p., 1 x ao dia) não foi capaz de prevenir o aumento na imunoreatividade para o GFAP induzido pela  $A\beta_{1-40}$  no cérebro de camundongos, um dia após o tratamento (Figura 7A,C). Esses resultados foram posteriormente confirmados através de experimentos realizados em animais com deleção para o  $TNFR1$  ( $TNFR1^{-/-}$ ) ou para a  $iNOS$  ( $iNOS^{-/-}$ ). Tanto os camundongos  $TNFR1^{-/-}$ , quanto  $iNOS^{-/-}$  apresentaram perfil similar de detecção para o GFAP quando comparados aos animais da linhagem controle ( $C57Bl/6$ , +/+), após o tratamento com  $A\beta_{1-40}$ , (Fig. 7B,D). Estes dados sugerem que a ativação dos astrócitos pela  $A\beta$  constitui um dos primeiros eventos durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer, sendo que estas células podem estar envolvidas no processo

inicial de produção e liberação de mediadores inflamatórios (p. ex. TNF- $\alpha$ ). No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.



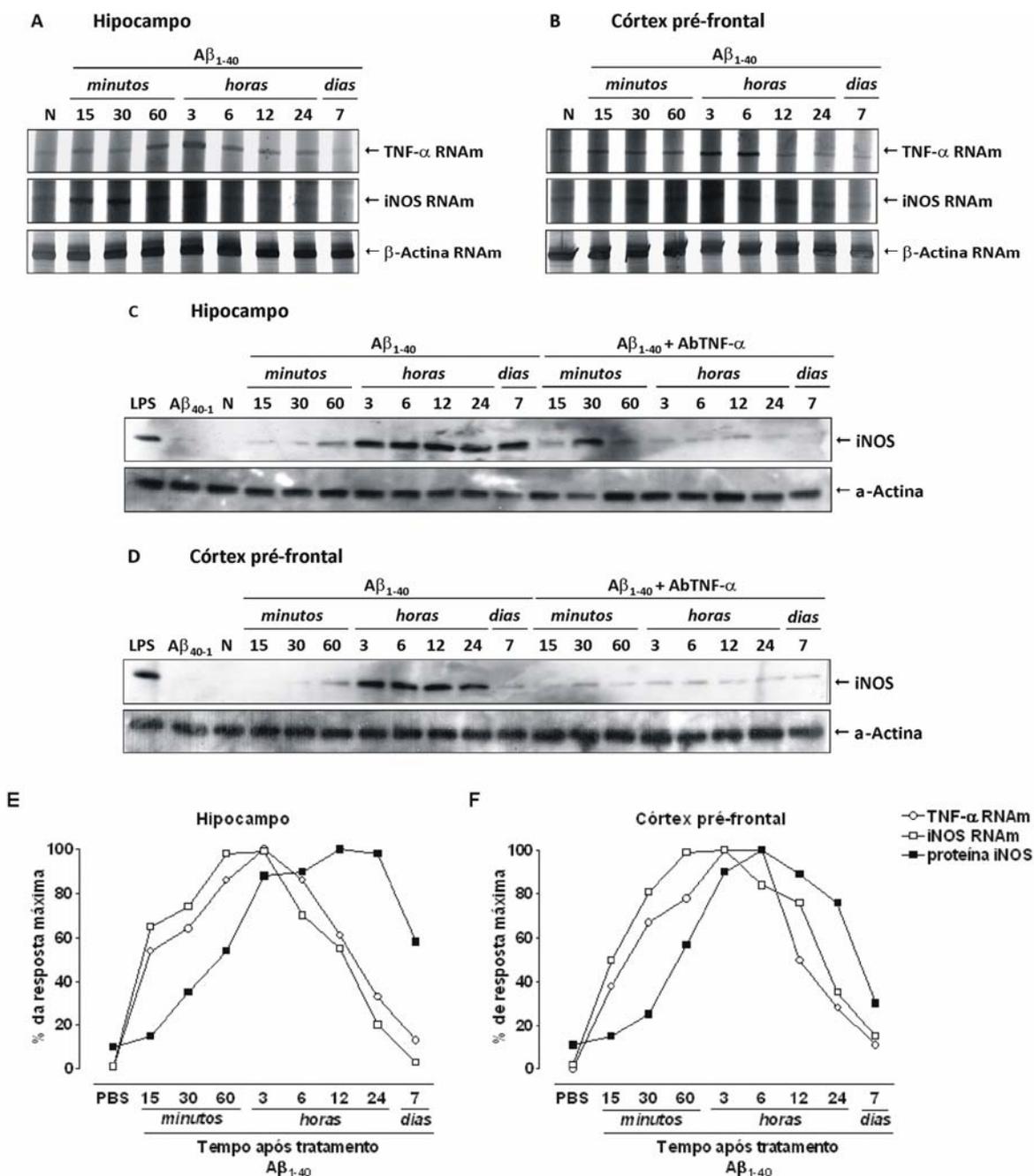
*Figura 7 - Ativação dos astrócitos pela injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ . A imunoreatividade para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) foi realizada 1 dia após a administração i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo). A contagem de células positivas para a GFAP foi realizada por meio de inspeção visual nas subregiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo utilizando microscópio óptico (aumento de 400 x). (A,B) Imagens representativas da imunoreatividade a GFAP no hipocampo (CA1). (A,C) O pré-tratamento com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo,*

i.c.v.) ou com o inibidor preferencial para iNOS aminoguanidina (AG, 100 mg/kg, i.p., 1 x ao dia) não alterou de forma significativa a ativação dos astrócitos pela  $A\beta_{1-40}$  no hipocampo de camundongos *Swiss* [ $F_{3,8} = 2,62$ ;  $P = 0,12$ ]. (B,D) Resultados similares foram verificados em animais com deleção para o *TNFR1* (*TNFR1<sup>-/-</sup>*) ou para a *iNOS* (*iNOS<sup>-/-</sup>*) [ $F_{3,8} = 2,79$ ;  $P = 0,11$ ]. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/PBS ou veículo/(+/+).

### *A $\beta_{1-40}$ estimula a expressão da iNOS através do aumento na síntese de TNF- $\alpha$*

A expressão do TNF- $\alpha$  e da iNOS foi avaliada no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos após diferentes períodos de tempo após o tratamento com  $A\beta_{1-40}$ , através das técnicas de RT-PCR e/ou *western blot*. Em condições basais, o RNAm para o TNF- $\alpha$  é detectado tanto no hipocampo quanto no córtex dos animais. O tratamento i.c.v. com  $A\beta_{1-40}$  promove um rápido aumento nos níveis do RNAm para o TNF- $\alpha$ , sendo que esse aumento ocorre após 15 min e permanece elevado até 24 h em ambas estruturas cerebrais (Fig. 8A,B). De maneira similar, a análise temporal demonstrou que a expressão do RNAm para a iNOS é mínima durante condições basais no hipocampo e no córtex pré-frontal. Todavia, um aumento dependente do tempo ocorre após a injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ , sendo a expressão máxima verificada entre 1 e 3 h, em ambas as estruturas cerebrais (Fig. 8A,B). Além disso, a análise por *western blot* revelou ausência da proteína iNOS nas amostras de córtex e hipocampo em condições basais. Por outro lado, a injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  resultou em aumento sustentado e duradouro da expressão da iNOS em ambas as estruturas cerebrais. Como verificado na figura 8 (C,D), nenhuma alteração na expressão da iNOS foi

verificada até 60 min, sendo que um aumento marcante ocorreu após 3 h e permaneceu elevado por até 7 dias após o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub>. A análise dos perfis temporais de expressão do RNAm para o TNF- $\alpha$  e iNOS, e da proteína iNOS sugerem uma possível relação entre esses eventos (Fig. 8E,F). Neste sentido, o efeito do tratamento com AbTNF- $\alpha$  sobre o aumento na expressão da iNOS induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> foi avaliado posteriormente. Através da realização do *western blot* foi verificado que o tratamento com AbTNF- $\alpha$  bloqueou quase que totalmente a expressão da iNOS no hipocampo (Fig. 8C) e córtex pré-frontal (Fig. 8D). Contudo, o tratamento com AbTNF- $\alpha$  não apresentou efeito sobre a expressão da proteína controle  $\beta$ -actina. Finalmente, como controle negativo, os animais foram tratados com o fragmento amilóide inverso (A $\beta$ <sub>40-1</sub>), sendo que nenhuma alteração no padrão de expressão do RNAm para o TNF- $\alpha$  ou iNOS (resultados não mostrados), ou da proteína iNOS (Fig. 8C,D) foi observado. Em conjunto, estes resultados indicam que a produção de TNF- $\alpha$  é um dos primeiros eventos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> e parece representar um importante sinal para a expressão da proteína iNOS neste modelo animal da doença de Alzheimer.



**Figura 8 – Participação do TNF-α na indução da iNOS pela injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub>.** Camundongos Swiss foram tratados com Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo; i.c.v.) (exceto *naive* (N), que indica os animais não tratados) e então o hipocampo e o córtex pré-frontal foram isolados nos períodos de tempo indicados. O RNA total foi isolado do (A) hipocampo e do (B) córtex pré-frontal para avaliação da expressão do TNF-α e iNOS através do RT-PCR. O RNAm para a β-actina foi utilizado como controle dos níveis de RNAm de cada amostra. Os níveis de RNAm para o TNF-α e iNOS

aumentaram de forma dependente do tempo após o tratamento com  $A\beta_{1-40}$ . Por outro lado, o nível de  $\beta$ -actina permaneceu inalterado. O tratamento com  $A\beta_{1-40}$  induz a expressão sustentada da proteína iNOS no (C) hipocampo e (D) córtex pré-frontal. O pré-tratamento com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) preveniu a expressão da iNOS induzida pela  $A\beta_{1-40}$  no hipocampo e no córtex pré-frontal. A imunodeteccção da proteína  $\alpha$ -actina foi utilizada como controle. O tratamento com o fragmento amilóide inverso  $A\beta_{40-1}$  (6 h) não foi capaz de induzir a expressão da proteína iNOS. Por outro lado, o tratamento com lipopolisacarídeo (LPS) de *E. coli* (2,5  $\mu$ g, i.c.v., 12 h, controle positivo), induziu a expressão da iNOS em ambas as estruturas cerebrais. Representação gráfica do perfil temporal de expressão do RNAm para o TNF- $\alpha$  e iNOS e da síntese da proteína iNOS no (E) hipocampo e (F) no córtex pré-frontal. Os resultados foram normalizados arbitrariamente a partir da resposta máxima obtida em cada análise e representam a média de 3 experimentos independentes.

#### *Estresse oxidativo induzido pela $A\beta_{1-40}$ depende do TNF- $\alpha$*

Evidências experimentais sugerem uma relação entre a  $A\beta$ , a expressão da iNOS e o estado redox das células. O NO gerado pela iNOS reage com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) produzindo peroxidonitrito ( $ONOO^-$ ), que exerce efeitos citotóxicos (Beckman et al., 1990). Sendo assim, pode-se supor que o aumento na expressão da enzima iNOS induzida pela  $A\beta_{1-40}$  é acompanhado por alterações oxidativas e, que esse fenômeno, é altamente dependente da produção de TNF- $\alpha$ . Para confirmar tal hipótese foi avaliado o nível de glutathiona (GSH) e a atividade das enzimas glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx) no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos. A injeção i.c.v. da  $A\beta_{1-40}$  reduziu o nível de GSH total 1 e 7

dias após o tratamento, sendo esse efeito acompanhado pelo aumento da atividade das enzimas GR e GPx no primeiro dia. 7 dias após a administração da  $A\beta_{1-40}$  a atividade das enzimas encontrava-se em nível basal (Fig. 9). Posteriormente, para analisar o possível efeito do TNF- $\alpha$  sobre as alterações no estado redox induzido pela  $A\beta_{1-40}$ , os animais foram tratados com AbTNF- $\alpha$  e os parâmetros da via da GSH foram avaliados. Como indicado pelo aumento no nível de GSH total e pela redução da atividade das enzimas GR e GPx, o tratamento com AbTNF- $\alpha$  preveniu as alterações oxidativas induzidas pela  $A\beta_{1-40}$  no hipocampo e córtex (Fig. 10). Estes resultados sugerem que o TNF- $\alpha$  é um importante modulador das respostas oxidativas induzidas pela  $A\beta_{1-40}$ .

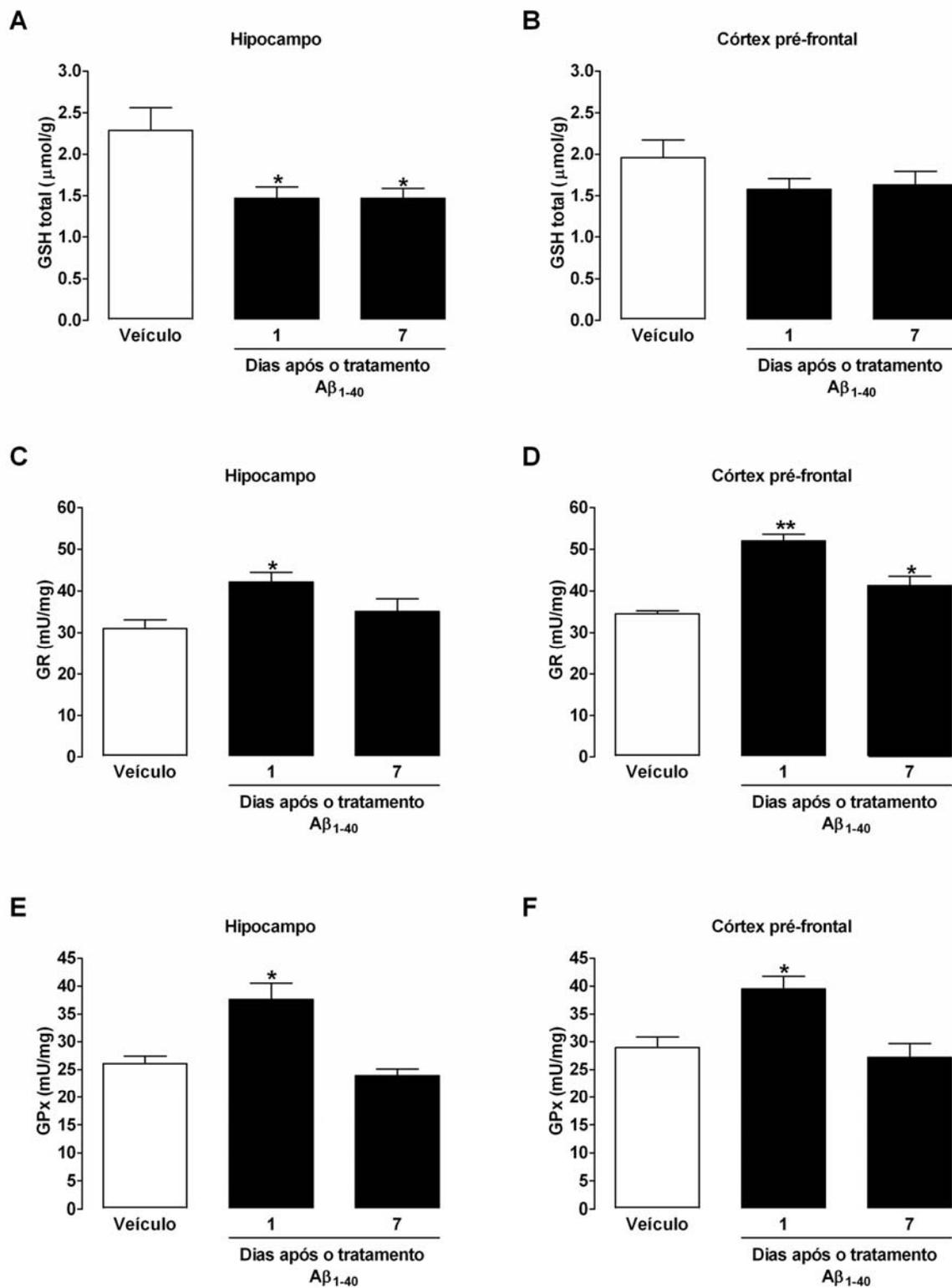


Figura 9 -  $A\beta_{1-40}$  altera parâmetros oxidativos celulares no cérebro. (A,B) O nível de glutatona total (GSH total) e a atividade das enzimas antioxidantes (C,D) glutatona redutase (GR) e (E,F) glutatona peroxidase (GPx) foram avaliados no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos *Swiss* 1 ou 7

dias após o tratamento com  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo) ou veículo (PBS). Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. dos níveis de GSH total ( $\mu\text{mol/g}$  de tecido) ou das atividades das enzimas GR ou GPX (mU/mg proteína) ( $n = 5-7$  camundongos por grupo). O nível de GSH total reduziu significativamente no hipocampo [ $P < 0,05$ ], mas não no córtex pré-frontal [ $P = 0,20$ ], após o tratamento com  $A\beta_{1-40}$ . Por outro lado, foi observado um aumento significativo na atividade das enzimas GR e GPx tanto no hipocampo [ $P < 0,05$  e  $P < 0,05$ ; respectivamente] quanto no córtex pré-frontal [ $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ ; respectivamente] 1 dia após a injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ . 7 dias após a administração de  $A\beta_{1-40}$ , estes valores estavam similares aos basais [exceto a atividade da GR no córtex pré-frontal,  $P < 0,05$ ]. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo veículo.

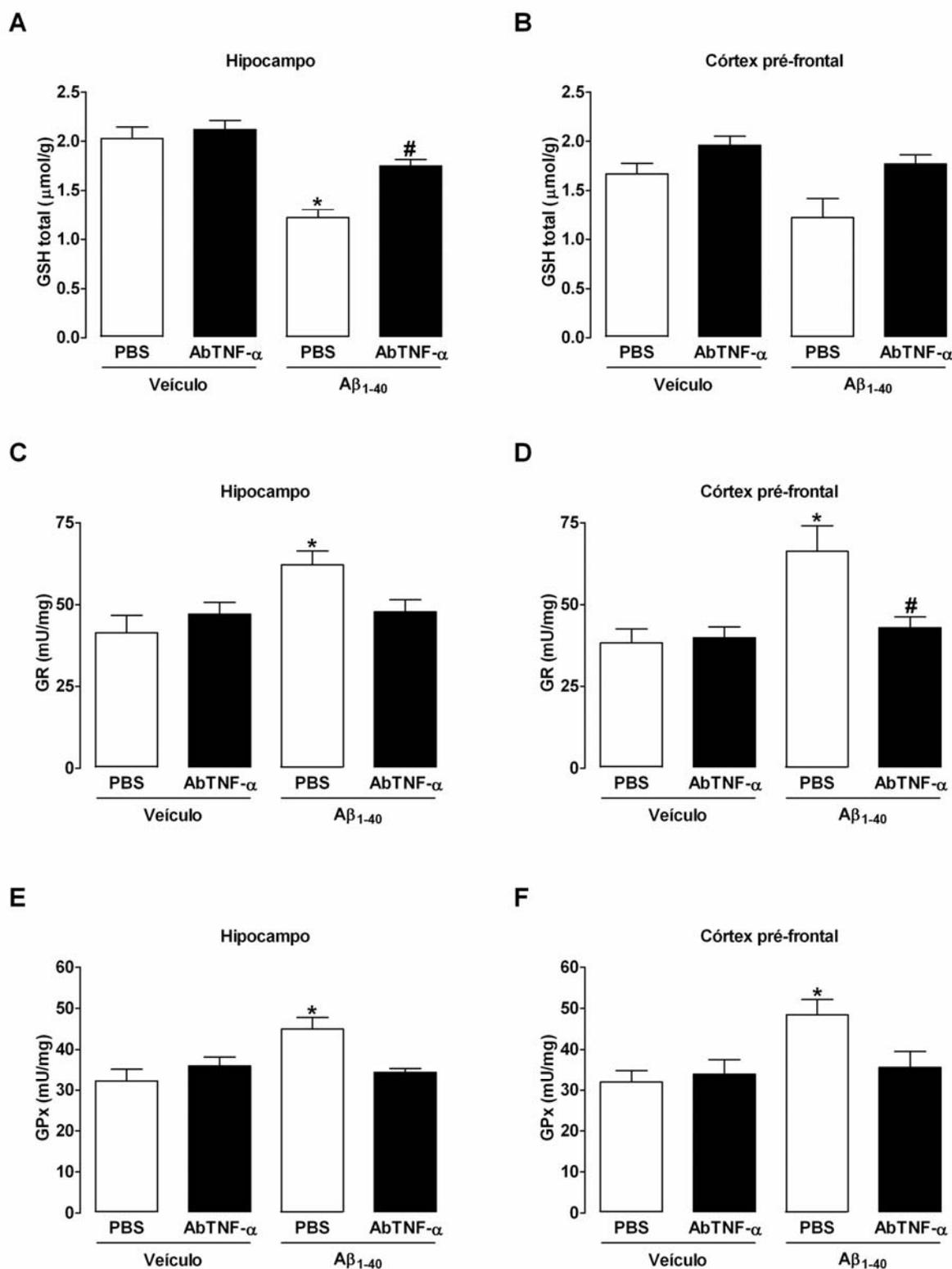


Figure 10 - Bloqueio do TNF- $\alpha$  previne alterações nos parâmetros oxidativos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Camundongos Swiss foram tratados com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) 15 min antes da injeção de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) ou veículo

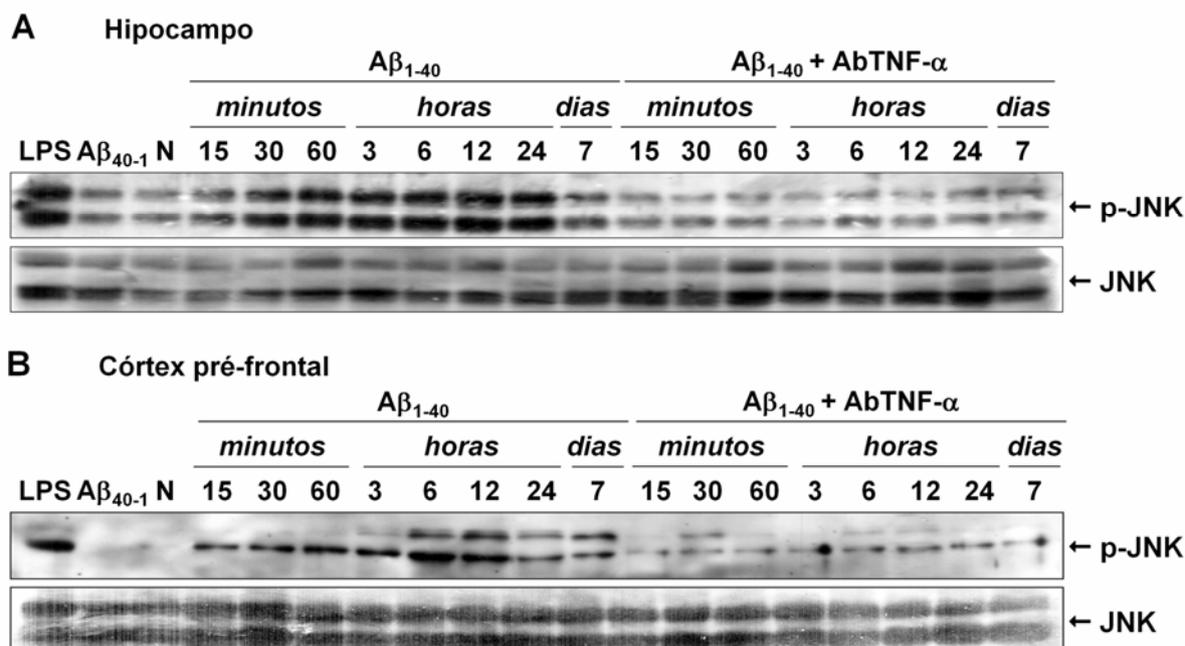
(PBS). (A,B) O nível de glutathiona total (GSH total) e a atividade das enzimas antioxidantes (C,D) glutathiona redutase (GR) e (E,F) glutathiona peroxidase (GPx) foram avaliados no hipocampo e córtex pré-frontal 24 h após o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. dos níveis de GSH total ( $\mu$ mol/g de tecido) ou das atividades das enzimas GR ou GPX (mU/mg proteína). (A) O tratamento com AbTNF- $\alpha$  preveniu a redução no nível de GSH total no hipocampo dos animais tratados com A $\beta$ <sub>1-40</sub> [ $F_{3,16} = 18,04$ ;  $P < 0,0001$ ]. O aumento na atividade das enzimas GR e GPx induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> foi inibido no (C,E) hipocampo [ $F_{3,16} = 2,05$ ;  $P < 0,05$  e  $F_{3,16} = 5,13$ ;  $P < 0,001$ ; respectivamente] e no (D,F) córtex pré-frontal [ $F_{3,16} = 5,68$ ;  $P < 0,01$  e  $F_{3,16} = 4,17$ ;  $P < 0,05$ ; respectivamente] pelo pré-tratamento com AbTNF- $\alpha$ . \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/PBS. # $P < 0,05$  comparado ao grupo A $\beta$ <sub>1-40</sub>/PBS.

#### *A via da JNK/c-Jun regula a expressão da iNOS induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>*

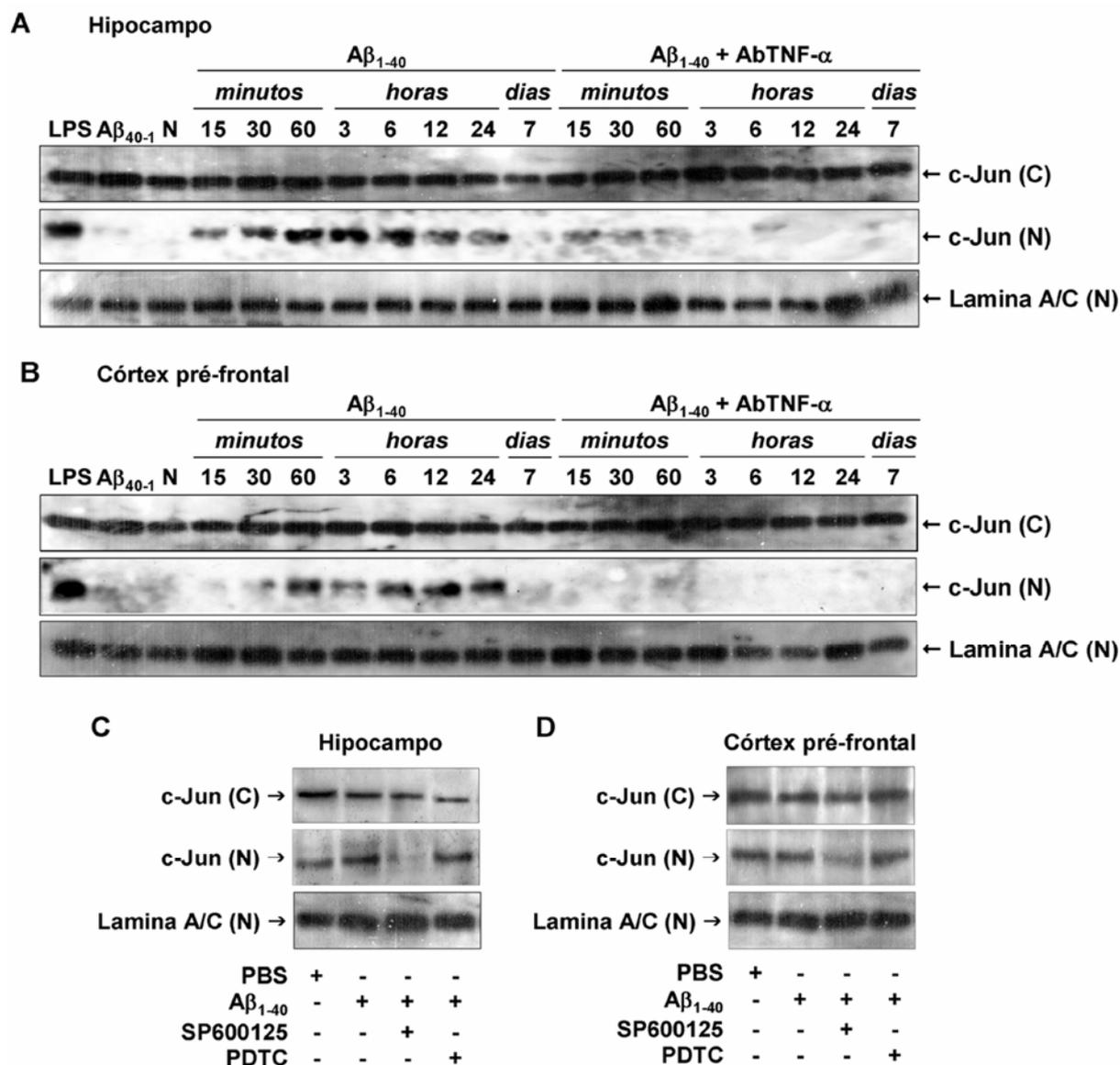
Evidências recentes indicam que a proteína quinase JNK e a sua proteína alvo c-Jun apresentam importante papel na disfunção neuronal observada na doença de Alzheimer. Neste sentido, foi avaliada a participação da via JNK/c-Jun sobre os efeitos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Durante condições basais, baixos níveis de JNK fosforilada (ativada) são detectados no hipocampo (Fig. 11A), mas não no córtex pré-frontal (Fig. 11B) dos animais. Contudo, o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> promove o aumento na ativação da JNK após 15 min, sendo que este efeito persiste por pelo menos 7 dias após o tratamento, em ambas as estruturas cerebrais. A ativação dependente do tempo da JNK é acompanhada pelo aumento da migração da proteína c-Jun do citoplasma para o núcleo, indicando uma associação entre tais eventos (Fig. 12A,B). Para confirmar essa hipótese, os animais foram

tratados com o inibidor seletivo da JNK SP600125 (50 mg/kg, i.p., 1 h antes da A $\beta$ <sub>1-40</sub>), sendo as amostras de hipocampo e córtex isoladas para análise pelo *western blot*. Como esperado, a migração da c-Jun para o núcleo (Fig. 12C,D) estava reduzida nos animais tratados com SP600125.

Sabendo que as proteínas JNK e c-Jun fazem parte da via de sinalização do TNF- $\alpha$  em vários processos patológicos e que a via JNK/c-Jun controla a atividade promotora do gene para iNOS, foi avaliada a possível associação entre estes eventos ativados pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> no hipocampo e córtex. O tratamento dos animais com o AbTNF- $\alpha$  reduziu a ativação da JNK e a consequente migração do c-Jun para o núcleo em ambas as estruturas cerebrais (Figs. 11 e 12). Além disso, a análise das amostras de hipocampo e córtex obtidas de animais tratados com SP600125 demonstrou uma redução parcial na expressão da iNOS, em comparação aos animais que receberam apenas A $\beta$ <sub>1-40</sub> (Fig. 14). Estes dados indicam uma seqüência de eventos celulares subsequente a administração i.c.v. da A $\beta$ <sub>1-40</sub>, envolvendo a produção de TNF- $\alpha$ , fosforilação da JNK, migração da c-Jun e expressão da iNOS.



*Figura 11 - Administração i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  promove a ativação da JNK. A ativação da proteína quinase citosólica JNK após a injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo) foi detectada no (A) hipocampo e (B) córtex pré-frontal através do anticorpo para a forma fosforilada da proteína (p-JNK). A proteína JNK não fosforilada foi utilizada como controle. A ativação da JNK parece depender do TNF- $\alpha$ . O pré-tratamento com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) preveniu a fosforilação da JNK no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos. O tratamento com o fragmento amilóide inverso  $A\beta_{40-1}$  (6 h) não foi capaz de induzir a ativação da JNK. A administração de lipopolisacarídeo (LPS) de *E. coli* (2,5  $\mu$ g, i.c.v., controle positivo), resultou na ativação da JNK 12 h após o tratamento.*



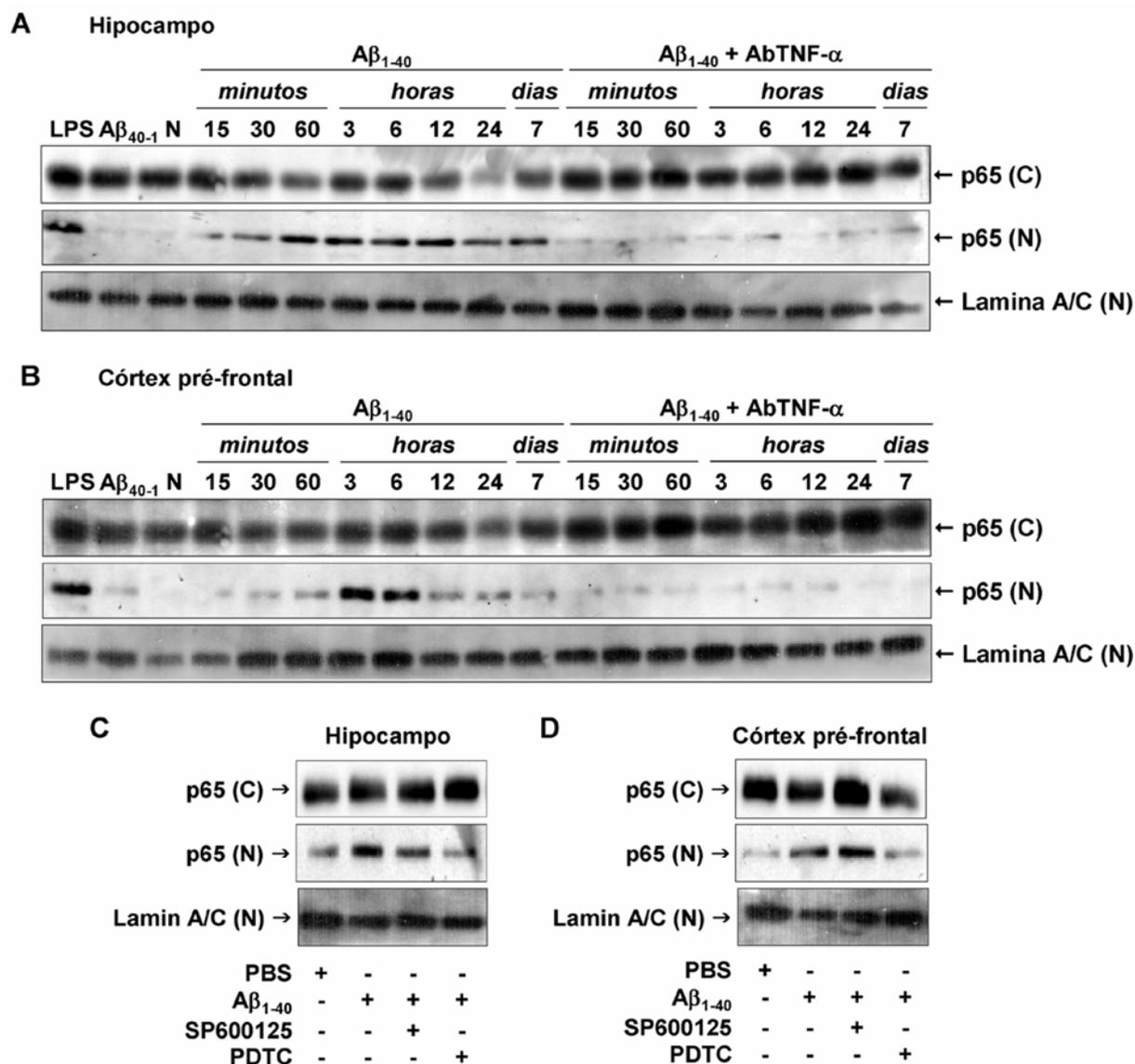
**Figura 12 – Ativação da c-Jun pela  $A\beta_{1-40}$ .** Cinética de migração da proteína c-Jun do citosol para o núcleo após o tratamento com  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo) no (A) hipocampo e (B) córtex pré-frontal. O pré-tratamento com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) preveniu a migração da c-Jun do citosol para o núcleo no hipocampo e córtex pré-frontal. A imunodeteção da proteína laminina A/C foi utilizada como controle. O tratamento com o fragmento amilóide inverso  $A\beta_{40-1}$  (6 h) não foi capaz de induzir a ativação da c-Jun. O controle positivo, lipopolisacarídeo (LPS) de *E. coli* (2.5  $\mu$ g, i.c.v., 12 h), induziu a ativação da c-Jun. O pré-tratamento com o inibidor da JNK

600125 (25 mg/kg, i.p.), mas não do NF- $\kappa$ B (PDTC, 100 mg/kg, i.p.), reduziu a ativação da c-Jun no (C) hipocampo e (D) córtex pré-frontal.

*O TNF- $\alpha$  regula a expressão da iNOS induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> através da via do NF- $\kappa$ B*

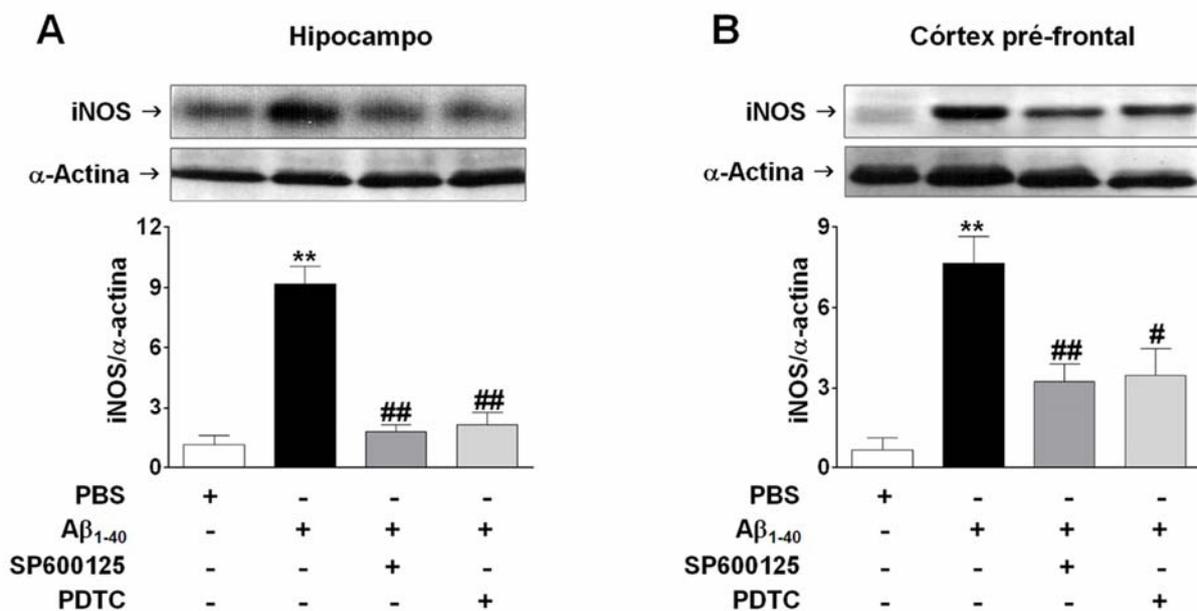
Durante condições homeostáticas o NF- $\kappa$ B permanece em estado não ativado no citoplasma celular associado à proteína I $\kappa$ B. Por outro lado, condições patológicas (incluindo a doença de Alzheimer) resultam na migração do NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde esse fator de transcrição regula e expressão de vários genes (Ghosh & Karin, 2002; Li & Verma, 2002). Esta série de experimentos teve como objetivo avaliar a possível participação do NF- $\kappa$ B no aumento da expressão da iNOS induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Inicialmente foi avaliado o perfil temporal de ativação do NF- $\kappa$ B após o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos. Como indicado na figura 13, o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> resultou no aumento dependente do tempo da detecção da proteína p65 NF- $\kappa$ B no conteúdo nuclear das amostras obtidas do hipocampo (Fig. 13A) e córtex pré-frontal (Fig. 13B), confirmando a ativação desse fator de transcrição. A ativação do NF- $\kappa$ B ocorreu entre 15-30 min após a injeção da A $\beta$ <sub>1-40</sub> e retornou ao nível basal 7 dias após o tratamento. Posteriormente, foi investigada a participação do TNF- $\alpha$  na ativação do NF- $\kappa$ B induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. O tratamento dos animais com o AbTNF- $\alpha$  praticamente aboliu a ativação do NF- $\kappa$ B, como indicado pela redução na detecção da proteína p65 NF- $\kappa$ B nas amostras nucleares. Finalmente, para determinar se a ativação do NF- $\kappa$ B poderia estar

relacionada ao aumento da expressão da iNOS induzida pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>, os animais foram tratados com o inibidor seletivo do NF- $\kappa$ B, PDTC, em uma dose efetiva em reduzir a migração da p65 NF- $\kappa$ B para o núcleo (Fig. 13C,D). O PDTC (100 mg/kg, i.p.) foi administrado 1 h antes da A $\beta$ <sub>1-40</sub>, sendo os tecidos coletados 24 h após para análise da expressão da iNOS pelo *western blot*. Os dados da Figura 14 indicam que o tratamento com PDTC reduziu de maneira significativa a expressão da iNOS no hipocampo e córtex dos camundongos. Coletivamente, esses resultados sugerem que a indução da expressão da iNOS pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> depende da ativação do NF- $\kappa$ B pela via de sinalização do TNF- $\alpha$ .



**Figura 13** – A ativação do NF- $\kappa$ B é dependente da via do TNF- $\alpha$ . Extrato citosólico e nuclear de (A) hipocampo e (B) córtex pré-frontal foram utilizados para avaliar a ativação da proteína p65 NF- $\kappa$ B após diferentes períodos de tempo da injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo). Os dados indicam que a  $A\beta_{1-40}$  induz a migração da proteína p65 NF- $\kappa$ B do citosol para o núcleo. O pré-tratamento com o anticorpo específico contra o TNF- $\alpha$  de camundongo (AbTNF- $\alpha$ , 10  $\eta$ g/camundongo, i.c.v.) preveniu a migração da p65 NF- $\kappa$ B tanto no hipocampo quanto córtex pré-frontal. A imunodeteccção da proteína laminina A/C foi utilizada como controle. O tratamento com o fragmento amilóide inverso  $A\beta_{40-1}$  (6 h) não foi capaz de induzir a migração da p65 NF- $\kappa$ B. Por outro lado, o tratamento com

lipopolisacarídeo (LPS) de *E. coli* (2,5 µg, i.c.v., 12 h, controle positivo) induziu a ativação do NF-κB em ambas as estruturas cerebrais. O pré-tratamento com o inibidor do NF-κB (PDTC, 100 mg/kg, i.p.), mas não com o inibidor da JNK 600125 (25 mg/kg, i.p.), reduziu a migração da proteína p65 NF-κB no (C) hipocampo e (D) córtex pré-frontal. Esses dados sugerem que as vias do NF-κB e JNK são ativadas de maneira independente pela Aβ<sub>1-40</sub>.



**Figura 14 – Administração i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> induz a expressão da iNOS através das vias JNK/c-Jun e NF-κB.** O envolvimento das vias de sinalização da JNK/c-Jun e do NF-κB sobre a expressão da iNOS foram avaliadas no (A) hipocampo e (B) córtex pré-frontal 24 h após a administração i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub>. O tratamento com o inibidor da JNK SP600125 (25 mg/kg, i.p.) ou com o inibidor do NF-κB PDTC (100 mg/kg, i.p.) 1 h antes da Aβ<sub>1-40</sub> reduziu a expressão da iNOS no hipocampo [ $F_{3,8} = 40,00$ ;  $P < 0,0001$ ] e córtex pré-frontal [ $F_{3,8} = 12,68$ ;  $P < 0,01$ ]. Os gráficos ilustram a densitometria óptica dos produtos do *western blot* para a iNOS normalizados pelos produtos da α-actina. Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo controle (PBS). # $P < 0,05$  e ## $P < 0,01$  comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

### ***Participação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas na prevenção do prejuízo cognitivo induzido pela Aβ<sub>1-40</sub>***

Trabalhos recentes sugerem a participação das cininas na fisiopatologia da doença de Alzheimer. Nesta série de experimentos foram avaliados os efeitos do bloqueio dos receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> para cininas na prevenção do prejuízo cognitivo induzido pela Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos. Para tal, camundongos *Swiss* foram previamente tratados i.c.v. com o antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) ou o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub>, Hoe 140 (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) e após 2 horas foram injetados i.c.v. (outro ventrículo) com Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) ou solução controle (PBS). Os animais foram treinados e testados no labirinto aquático, respectivamente, 7 e 8 dias após os tratamentos. A administração prévia de des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK não alterou de maneira significativa o prejuízo induzido pela Aβ nas sessões de treino (Figura 15A) e teste (Figura 15B) no labirinto aquático, em nenhuma das doses testadas. Por outro lado, os animais previamente tratados com Hoe 140, nas doses de 10 e 50 pmol/camundongo (i.c.v.) e, que receberam a injeção de Aβ<sub>1-40</sub>, apresentaram latências menores para encontrar a plataforma durante as sessões de treino (Figura 16A) e permaneceram mais tempo no quadrante correto durante a sessão de teste (Figura 16B), quando comparados aos animais que receberam Aβ<sub>1-40</sub>/PBS. Posteriormente, estes dados foram confirmados através de experimentos realizados em animais com deleção no gene para o receptor B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) ou B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>). Como ilustrado na Figura 15(C,D), os animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> apresentaram prejuízo cognitivo similar

aos animais da linhagem selvagem (*C57Bl/6*, +/+) quando submetidos ao labirinto aquático, 7 dias após a injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ . Por outro lado, a deleção gênica do receptor  $B_2$  reduziu de maneira significativa o prejuízo cognitivo induzido pela  $A\beta_{1-40}$  quando avaliados 7 dias após o tratamento. Os animais  $B_2R^{-/-}$  apresentaram latências menores para encontrar a plataforma durante as sessões de treino (Figura 16C) e permaneceram mais tempo no quadrante correto durante a sessão de teste (Figura 16D), em comparação aos animais da linhagem selvagem (*C57Bl/6*, +/+) tratados com  $A\beta_{1-40}$ . Em conjunto, esses dados indicam a participação do  $B_2R$ , mas não do  $B_1R$ , no desenvolvimento do prejuízo de memória espacial induzido pela  $A\beta$ .

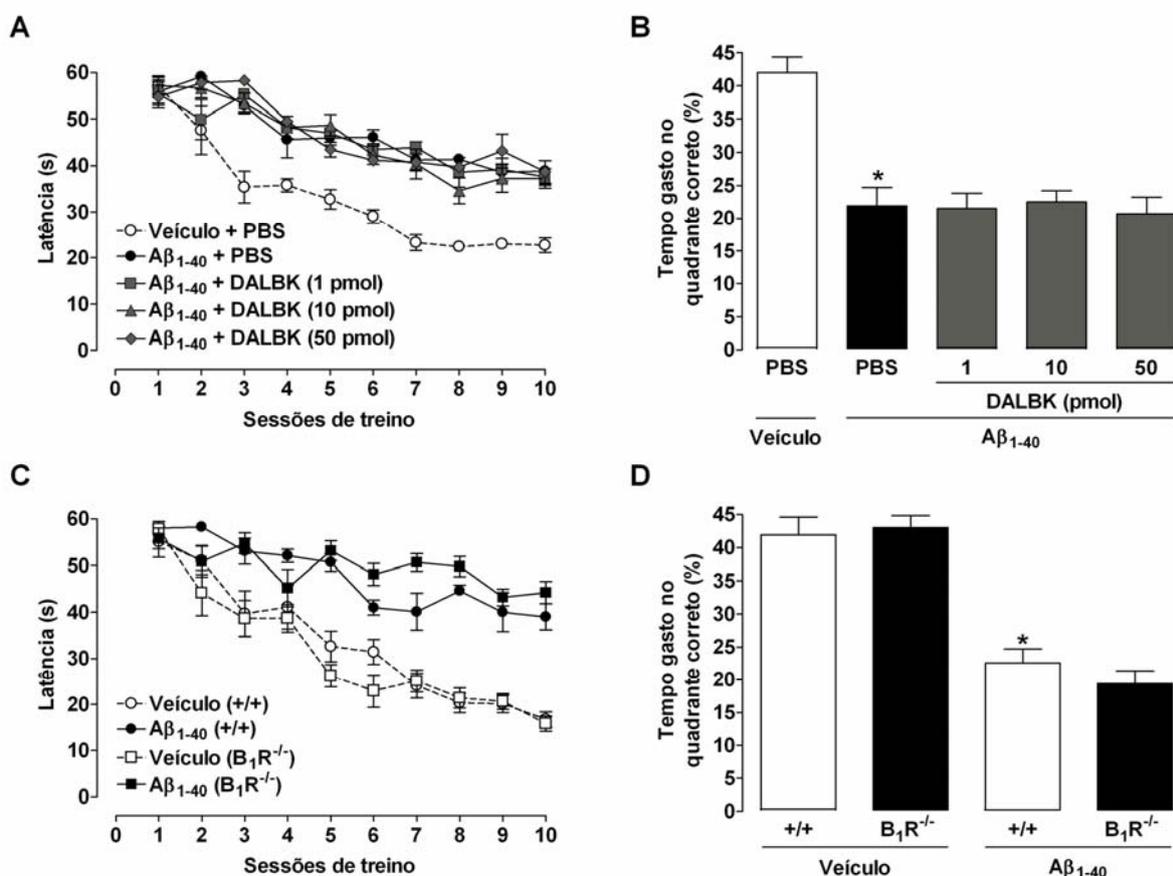


Figura 15 - Efeito do bloqueio do receptor  $B_1$  para cininas na prevenção dos prejuízos cognitivos induzidos pela  $A\beta_{1-40}$ . Os animais foram treinados e

testados no labirinto aquático, respectivamente, 7 e 8 dias após os tratamentos. (A,B) O pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor  $B_1$  des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) ou, (C,D) a deleção gênica do receptor  $B_1$  ( $B_1R^{-/-}$ ), não alteraram o declínio cognitivo induzido pela  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo), como demonstrado pelos resultados obtidos nas sessões de treino [des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK:  $F_{4,32} = 18,75$ ;  $P = 0,24$  -  $B_1R^{-/-}$ :  $F_{1,29} = 0,01$ ;  $P = 0,91$ ] e teste [des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK:  $F_{4,32} = 18,75$ ;  $P = 0,0001$  -  $B_1R^{-/-}$ :  $F_{1,29} = 0,49$ ;  $P = 0,48$ ] do labirinto aquático de Morris. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/PBS ou veículo/(+/+).

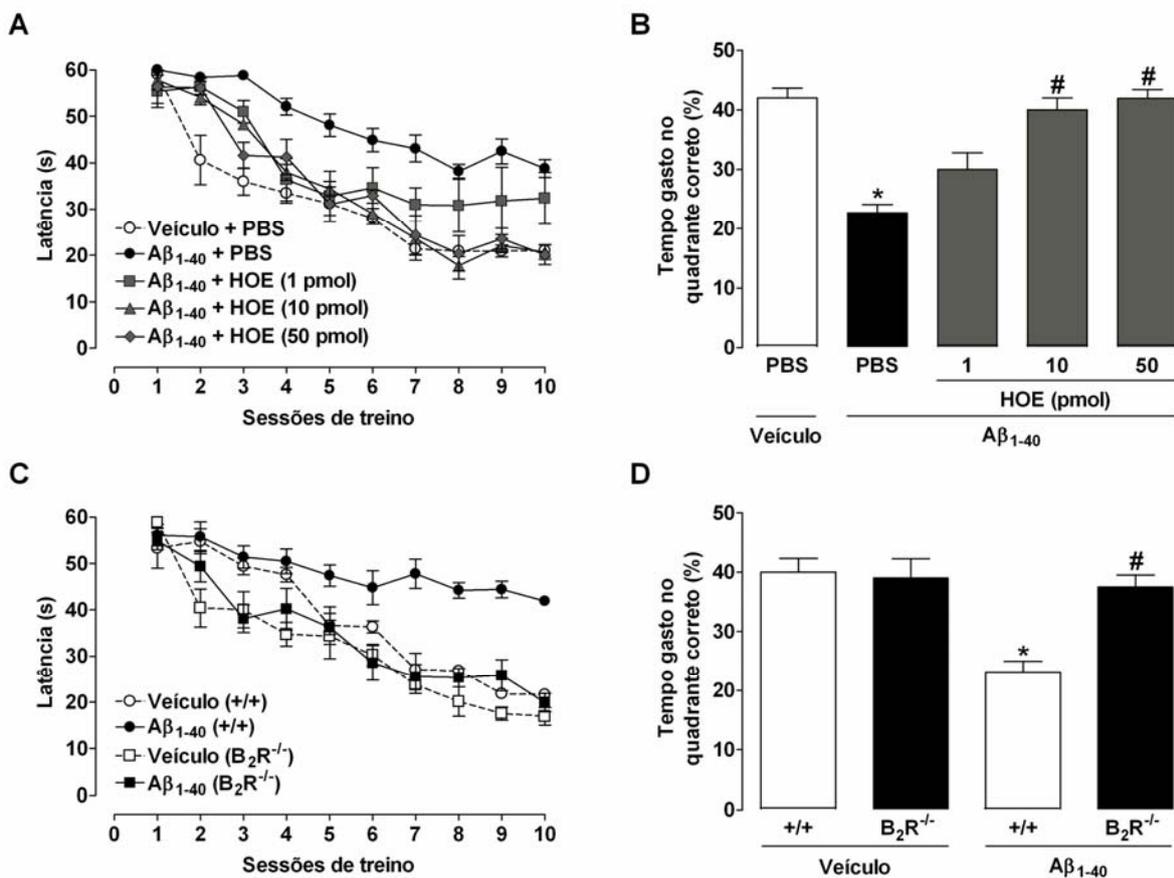


Figura 16 – Efeito do bloqueio do receptor  $B_2$  para cininas na prevenção dos prejuízos cognitivos induzidos pela  $A\beta_{1-40}$ . Os animais foram treinados e testados no labirinto aquático, respectivamente, 7 e 8 dias após os tratamentos. (A,B) O pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor

**B<sub>2</sub> Hoe 140 (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) ou, (C,D) a deleção gênica do receptor B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>), reduziram o declínio de memória espacial induzido pela Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo), como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma na sessão de treino [Hoe 140: F<sub>4,32</sub> = 18,75; P < 0,0001 - B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>: F<sub>1,31</sub> = 81,04; P < 0,0001] e pelo aumento na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste [Hoe 140: F<sub>4,32</sub> = 18,64; P < 0,0001 - B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>: F<sub>1,31</sub> = 13,98; P < 0,001], quando comparados ao grupo que recebeu Aβ<sub>1-40</sub>. Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. \*P < 0,05 comparado ao grupo veículo/PBS ou veículo/(+/+). #P < 0,05 comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>/PBS ou Aβ<sub>1-40</sub>/(+/+).**

### ***Participação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas na reversão do dano cognitivo induzidos pela Aβ<sub>1-40</sub>***

O efeito do bloqueio dos receptores para as cininas na reversão do dano cognitivo induzido pela Aβ<sub>1-40</sub> foi avaliado em camundongos *Swiss*, 7 dias após o tratamento. Os animais foram tratados com o antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) ou com o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> Hoe 140 (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) e 6 h após foram realizadas as sessões de treino no labirinto aquático. Como demonstrado na Figura 17, a administração de Hoe 140, mas não de des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK, alterou significativamente o prejuízo cognitivo induzido pela Aβ<sub>1-40</sub>. O tratamento com Hoe 140 (10 ou 50 pmol/camundongo) resultou em redução na latência para encontrar a plataforma durante as sessões de treino (Figura 17C) e aumento na preferência pelo quadrante correto durante a sessão de teste (Figura 16B), em relação aos animais que receberam Aβ<sub>1-40</sub>/PBS.

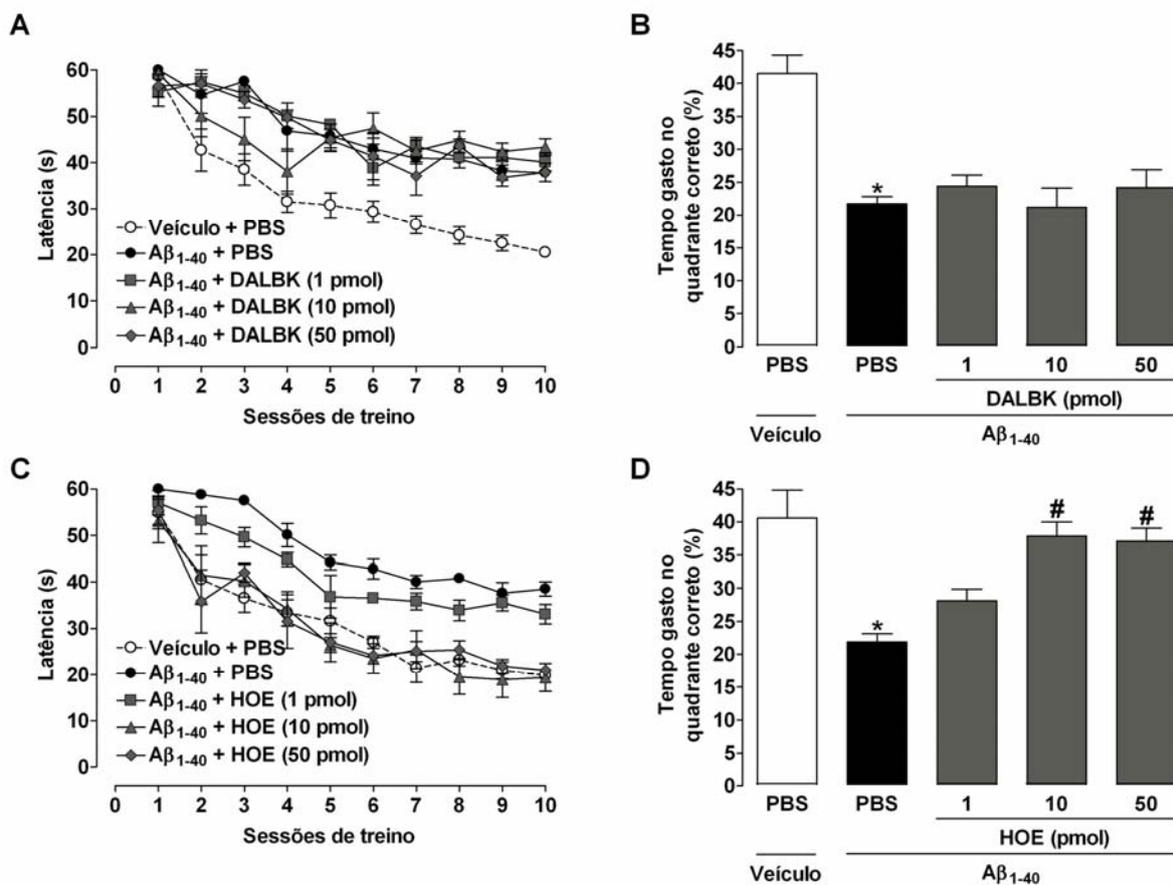
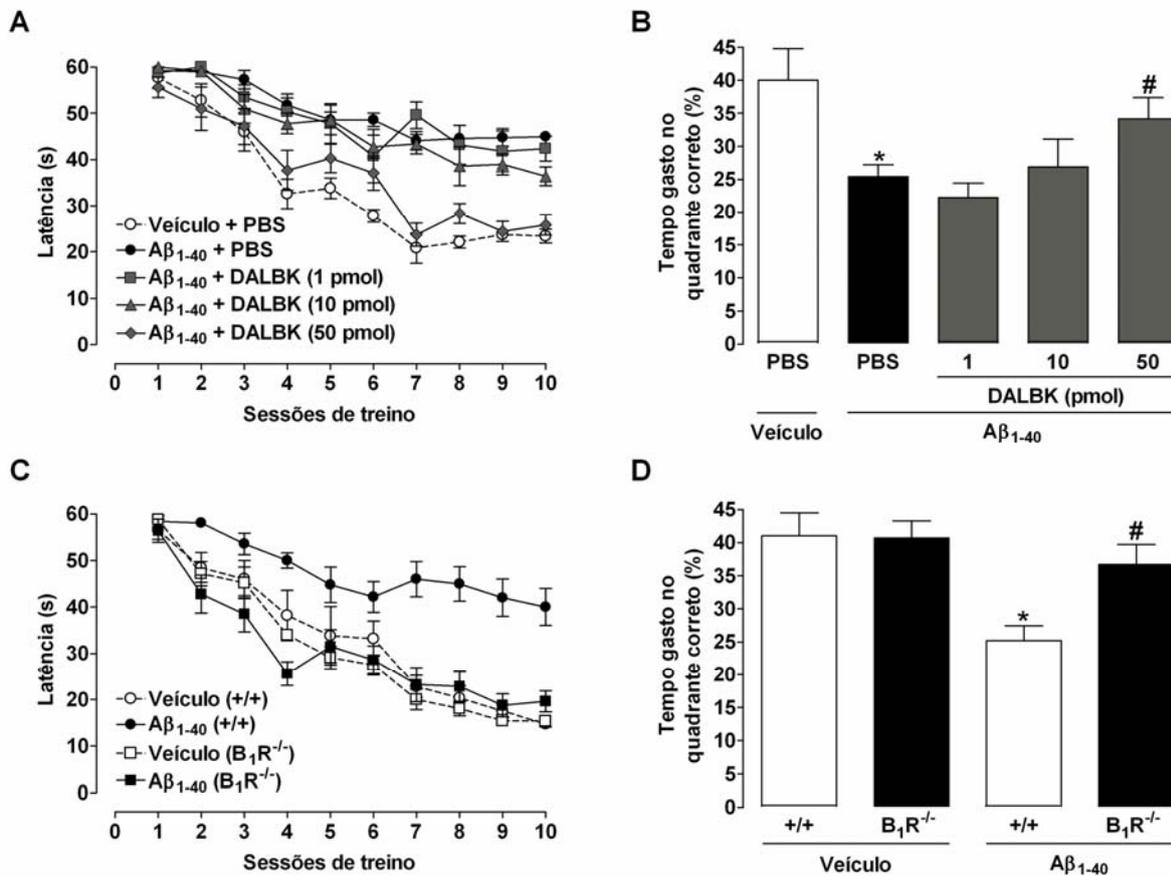


Figura 17 - Reversão do dano cognitivo induzido pela Aβ<sub>1-40</sub> através do bloqueio do receptor B<sub>2</sub>. Os animais foram treinados e testados no labirinto aquático, respectivamente, 7 e 8 dias após os tratamentos. O tratamento com o antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) não foi capaz de reverter o prejuízo cognitivo induzido pela Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo). Animais tratados com a des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK apresentaram resultados similares aos animais tratados com Aβ<sub>1-40</sub>/PBS nas sessões de (A) treino [ $F_{4,35} = 20,04$ ;  $P < 0,0001$ ] e (B) teste [ $F_{4,35} = 20,04$ ;  $P < 0,0001$ ]. Por outro lado, o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> Hoe 140 (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) reverteu o declínio de memória espacial induzido pela Aβ<sub>1-40</sub>, como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma na (C) sessão de treino [ $F_{4,35} = 20,04$ ;  $P < 0,0001$ ] e pelo aumento na preferência pelo quadrante correto na (D) sessão de teste [ $F_{4,35} = 9,10$ ;  $P < 0,0001$ ], quando comparados ao grupo que recebeu Aβ<sub>1-40</sub>/PBS. As sessões de treino no labirinto aquático foram realizadas 6 horas

após a administração dos antagonistas. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/PBS. # $P < 0,05$  comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ /PBS.

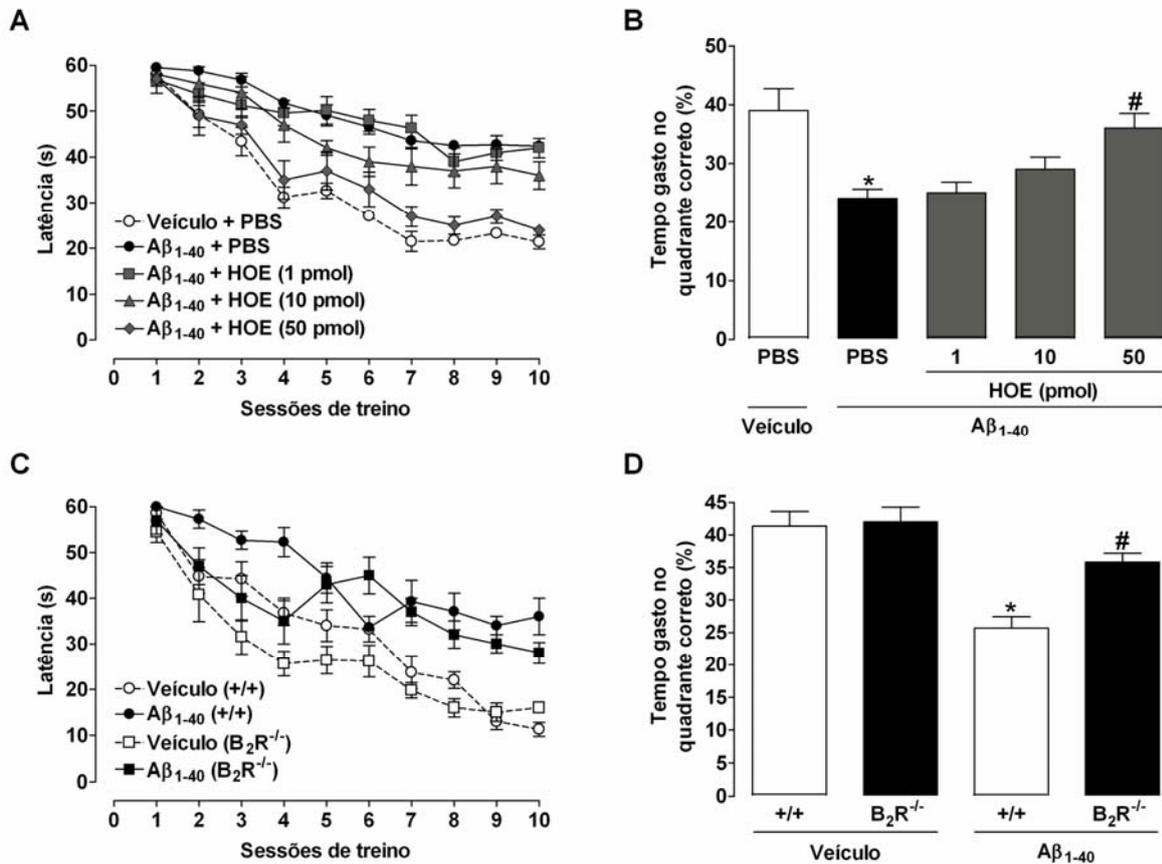
A propriedade do  $B_1R$  de ser induzido durante condições patológicas sugere uma possível participação tardia desse receptor no processo de dano cognitivo induzido pela  $A\beta_{1-40}$ . Para avaliar tal hipótese, inicialmente foi demonstrado que o prejuízo na memória espacial em camundongos persiste por até 30 dias do tratamento com  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo, i.c.v.) (Fig. 18). Posteriormente, através do tratamento com antagonistas seletivos e pelo uso dos animais com deleção gênica, foi avaliada a participação dos receptores para as cininas. O tratamento com o antagonista seletivo do receptor  $B_1$  des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) ou com o antagonista seletivo do receptor  $B_2$  Hoe 140 (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) foi realizado 30 dias após a injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (6 h antes do treino). De maneira surpreendente, tanto a des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (Fig. 18), quanto o Hoe 140 (Fig. 19), reduziram significativamente os danos cognitivos induzidos pela  $A\beta_{1-40}$ , como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma durante as sessões de treino e pelo aumento na preferência pelo quadrante correto durante a sessão de teste, quando comparados aos animais que receberam  $A\beta_{1-40}$ /PBS. Além disso, resultados similares foram verificados em animais  $B_1R^{-/-}$  e  $B_2R^{-/-}$ . Os dados das figuras 18 e 19 indicam que a deleção gênica do  $B_1R$  ou do  $B_2R$  inibe o prejuízo de memória espacial induzido pela  $A\beta_{1-40}$ , quando comparados aos animais da linhagem controle (*C57Bl/6*, +/+). Em conjunto, estes dados sugerem um importante papel das

vias de sinalização dos receptores para as cininas nos prejuízos de aprendizado e memória induzidos pela  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.



**Figura 18 – Reversão tardia do dano cognitivo induzido pela  $A\beta_{1-40}$  através do bloqueio do receptor  $B_1$ .** Os animais foram treinados e testados no labirinto aquático, respectivamente, 30 e 31 dias após os tratamentos. (A,B) O tratamento com o antagonista seletivo do receptor  $B_1$  des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) ou (C,D) a deleção gênica do  $B_1R$  ( $B_1R^{-/-}$ ) reduzem o declínio de memória espacial induzido pela  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo), como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma na sessão de treino [des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK:  $F_{4,35} = 21,17$ ;  $P < 0,0001$  -  $B_1R^{-/-}$ :  $F_{1,30} = 39,01$ ;  $P < 0,0001$ ] e pelo aumento na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste [des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK:  $F_{4,35} = 6,27$ ;  $P < 0,001$  -  $B_1R^{-/-}$ :  $F_{1,30} = 5,29$ ;  $P < 0,01$ ] quando comparados ao grupo que recebeu  $A\beta_{1-40}$ . As sessões de treino no labirinto aquático foram realizadas 6 horas após a administração da des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK. Os valores estão expressos como a

média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo/PBS ou veículo/(+/+).  
 # $P < 0,05$  comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ /PBS ou  $A\beta_{1-40}$ /(+/+).

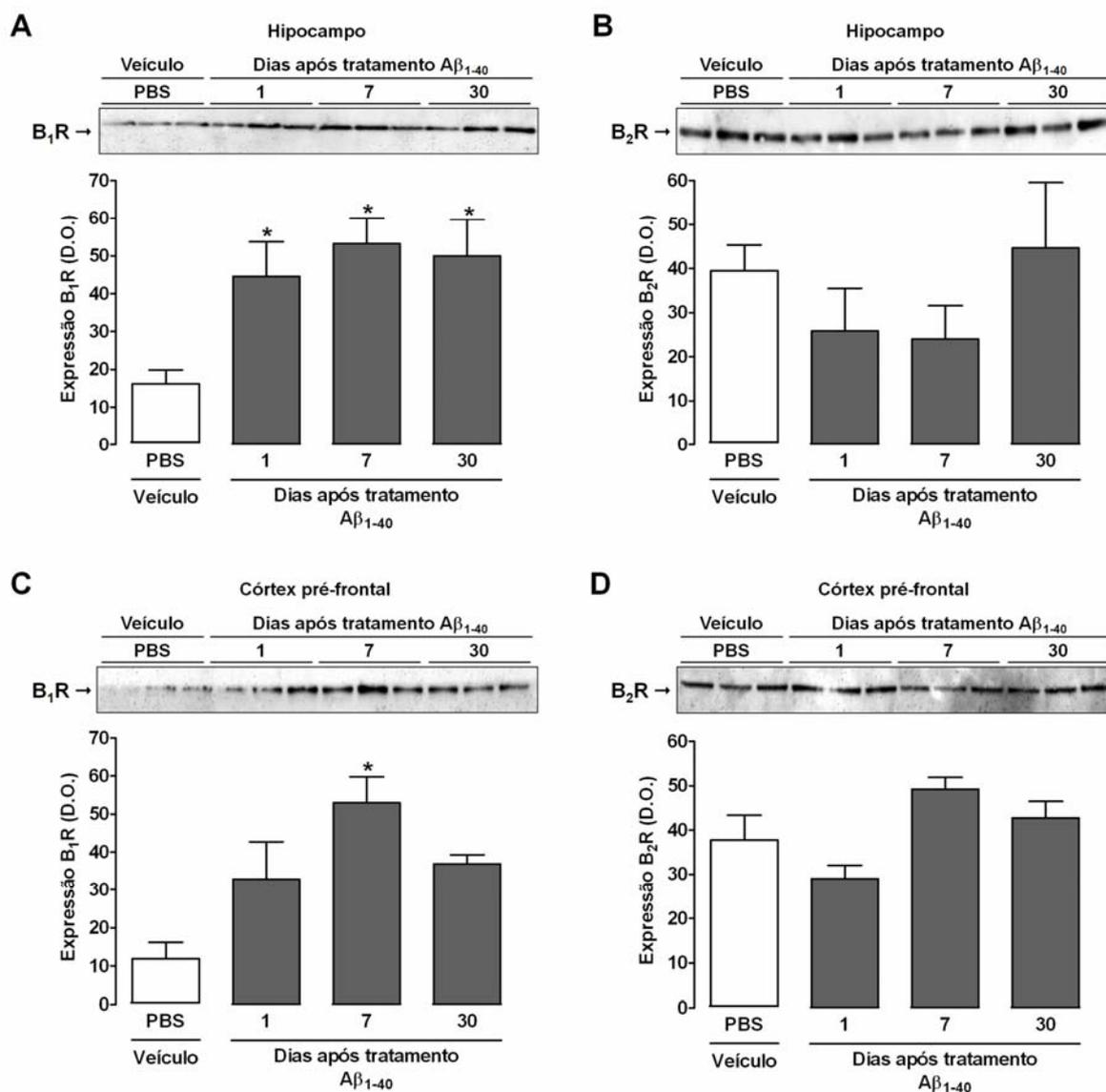


**Figura 19 – Reversão tardia do dano cognitivo induzido pela  $A\beta_{1-40}$  através do bloqueio do receptor  $B_2$ .** Os animais foram treinados e testados no labirinto aquático, respectivamente, 30 e 31 dias após os tratamentos. (A,B) O tratamento com o antagonista seletivo do receptor  $B_2$ , Hoe 140 (1, 10 ou 50 pmol/camundongo, i.c.v.) ou (C,D) a deleção gênica do  $B_2R$  ( $B_2R^{-/-}$ ) reduzem o declínio de memória espacial induzido pela  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo), como indicado pela redução na latência para encontrar a plataforma na sessão de treino [Hoe 140:  $F_{4,35} = 6,27$ ;  $P < 0,001$  -  $B_2R^{-/-}$ :  $F_{1,29} = 16,20$ ;  $P < 0,001$ ] e pelo aumento na preferência pelo quadrante correto na sessão de teste [Hoe 140:  $F_{4,35} = 6,27$ ;  $P < 0,001$  -  $B_2R^{-/-}$ :  $F_{1,29} = 7,08$ ;  $P < 0,05$ ], quando comparados ao grupo que recebeu  $A\beta_{1-40}$ . As sessões de treino no labirinto aquático foram realizadas 6 horas após a administração do Hoe 140. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m. \* $P < 0,05$

comparado ao grupo veículo/PBS ou veículo/(+/+). # $P < 0,05$  comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ /PBS ou  $A\beta_{1-40}$ /(+/+).

*Avaliação da expressão dos receptores para as cininas após a injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$*

A análise dos resultados comportamentais indica uma possível regulação na expressão dos receptores para as cininas pela  $A\beta_{1-40}$ . Deste modo, a expressão do  $B_1R$  e do  $B_2R$  foi avaliada no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos após diferentes períodos de tempo do tratamento com  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo, i.c.v.) através da técnica de *western blot*. Como esperado, durante condições homeostáticas, a expressão do  $B_1R$  foi mínima em ambas as estruturas cerebrais. Contudo, a administração de  $A\beta_{1-40}$  resultou em um aumento dependente do tempo e sustentado na imunodeteção do  $B_1R$ , tanto no hipocampo (Fig. 20A) quanto no córtex pré-frontal (Fig. 20C) dos camundongos. Por outro lado, o tratamento com  $A\beta_{1-40}$  não foi capaz de promover alteração significativa na imunodeteção para o  $B_2R$  no hipocampo (Fig. 20B) e córtex pré-frontal (Fig. 20D). Esses dados sugerem uma possível regulação na expressão do  $B_1R$  durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer.



*Figura 20 – Efeito da Aβ<sub>1-40</sub> na expressão dos receptores para cininas.* Camundongos *Swiss* foram tratados com Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo; i.c.v.) (exceto *naïve*, que indica os animais não tratados) e então o hipocampo e o córtex pré-frontal foram isolados nos períodos de tempo indicados. O tratamento com Aβ<sub>1-40</sub> induz a expressão sustentada do B<sub>1</sub>R no (A) hipocampo [ $F_{3,8} = 4,83$ ;  $P < 0,05$ ] e (C) córtex pré-frontal [ $F_{3,8} = 696$ ;  $P < 0,01$ ]. No entanto, a expressão do B<sub>2</sub>R não altera significativamente após a injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> no hipocampo [ $F_{3,8} = 1,01$ ;  $P = 0,44$ ] (Fig. 20B) e córtex pré-frontal [ $F_{3,8} = 1,82$ ;  $P = 0,15$ ]. Os gráficos indicam a quantificação por densitometria óptica (D.O.) da expressão dos receptores para as cininas. Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (unidade arbitrária) de 3

experimentos independentes. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (naïve).

## DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer é caracterizada por desordens neurodegenerativas intimamente associadas ao processo de envelhecimento. Suas principais características são o acúmulo de placas compostas pelo peptídeo  $A\beta$  no parênquima extracelular do cérebro (Glenner e Wong, 1984) e a formação de emaranhados neurofibrilares, como resultado da hiperfosforilação da proteína *Tau* associada aos microtúbulos, no interior dos neurônios (Grundke-Iqbal et al., 1986). Além disso, o acúmulo destes marcadores é normalmente acompanhado pela perda de neurônios, principalmente em áreas corticais e formação hipocampal, resultando na perda progressiva das funções cognitivas (Selkoe, 2000). De maneira interessante, o presente estudo demonstra que uma única administração i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  resulta em prejuízos importantes nas funções de aprendizado e de memória. Nossos dados indicam que o tratamento com o fragmento  $A\beta_{1-40}$ , mas não com o fragmento inverso  $A\beta_{40-1}$ , 7 ou 30 dias antes dos experimentos, foi capaz de promover prejuízo similar na memória espacial em camundongos das linhagens *Swiss* e *C57Bl/6*, como indicado pelo aumento nas latências para encontrar a plataforma durante as sessões de treino e pelo percentual de tempo gasto no quadrante correto durante a sessão de teste do labirinto aquático, respectivamente. Estes resultados estendem dados prévios da literatura obtidos com os peptídeos  $A\beta_{1-42}$  (Yan et al., 2001; Jhoo et al., 2004) e  $A\beta_{25-35}$  (Maurice et al., 1996). Outro aspecto importante observado no presente estudo, foi o fato que o dano cognitivo é acompanhado pela perda da viabilidade sináptica, uma vez que também é

observada redução nos níveis da proteína pré-sináptica sinaptofisina nos cérebros dos animais tratados com  $A\beta_{1-40}$ . Todavia, como em todo modelo experimental, existem limitações que devem ser ressaltadas, como por exemplo, a ausência tanto na formação de placas senis, quanto na indução da morte celular, pelo menos até 7 dias após o tratamento com  $A\beta_{1-40}$ . Em conjunto, estes dados corroboram com a hipótese que durante a progressão da doença de Alzheimer a disfunção sináptica precede a morte neuronal (Selkoe, 2000). Desta forma, a injeção aguda de fragmentos amilóides em roedores parece ser um bom modelo experimental para o estudo dos mecanismos moleculares e de possíveis abordagens terapêuticas futuras, relacionados aos primeiros estágios da doença de Alzheimer. Entretanto, outras abordagens experimentais devem ser aplicadas quando o objetivo é caracterizar as etapas mais tardias dessa patologia.

O teste do labirinto aquático, originalmente proposto por Morris e colaboradores (1982) para o estudo da memória espacial em roedores, representa um paradigma complexo onde o desempenho dos animais é influenciado por uma série de fatores atencionais e motivacionais, bem como pela função motora dos animais, que em conjunto são determinantes para o sucesso no encontro da plataforma submersa. Portanto, é importante enfatizar que os camundongos tratados com o peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , independente da linhagem utilizada (*Swiss* ou *C57Bl/6*), não diferiram dos animais tratados com a solução controle nos parâmetros locomotores (número de cruzamentos e *rearing*) avaliados no teste do campo aberto. Estes resultados nos permitem assegurar que a queda no desempenho

apresentado pelos camundongos tratados com A $\beta$ <sub>1-40</sub> no labirinto aquático é decorrente de prejuízo nas função de memória espacial.

De forma geral, a inflamação pode ser definida como um conjunto de interações complexas entre fatores solúveis e células, que ocorre nos tecidos em resposta a danos traumáticos, infecciosos, pós-isquêmicos ou tóxicos (Nathan, 2002). Neste sentido, em circunstâncias normais, a ativação da inflamação apresenta papel benéfico para os indivíduos. Por outro lado, quando a resposta inflamatória torna-se crônica ela pode causar graves efeitos ao organismo. O processo inflamatório é caracterizado por três eventos principais que incluem o aumento substancial do suprimento de sangue para o local afetado, o aumento da permeabilidade vascular e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. O influxo celular é regulado por moléculas solúveis e difusíveis, produzidas principalmente por células inflamatórias, plaquetas, células endoteliais e mastócitos (Sharma e Buchanan, 1994; Levy, 1996). As moléculas solúveis envolvidas na inflamação, ou mediadores inflamatórios, compreendem produtos da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina), mediadores lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas e fator de ativação plaquetária), citocinas, quimiocinas, componentes do sistema complemento e o óxido nítrico (NO). Além destes, mediadores peptídicos como as cininas, neurocininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre outros, também exercem papel relevante no processo inflamatório. Todavia, a resposta inflamatória verificada no sistema nervoso central parece diferir em alguns aspectos daquela verificada em tecidos periféricos. Pelo fato do cérebro não

apresentar fibras nociceptivas, torna-se difícil o reconhecimento do início do processo inflamatório, sendo que os sinais clássicos da inflamação (rubor, tumor, calor e dor) não são observados no sistema nervoso central. Além disso, a presença da barreira hematoencefálica é capaz de reduzir substancialmente a entrada de células inflamatórias, patógenos e de algumas macromoléculas no espaço subaracnoídeo, fazendo com que o processo inflamatório no cérebro transcorra de maneira bastante peculiar (Tuppo e Arias, 2005).

Inúmeros estudos têm demonstrado que, além das características típicas, o cérebro de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer apresenta sinais evidentes da ativação do processo inflamatório e da resposta imune (Akiyama et al., 2000; Wyss-Coray e Mucke, 2002). No entanto, o papel da inflamação no desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer ainda é pouco compreendido. Estudos epidemiológicos revelam que indivíduos que fizeram ou fazem uso prolongado de antiinflamatórios não esteroidais apresentam menor risco no desenvolvimento da doença de Alzheimer, sugerindo que o processo neuroinflamatório pode contribuir para a progressão desta patologia (Rogers et al., 1993; Rich et al., 1995; Breitner, 1996; McGeer et al., 1996; In't Veld et al., 2001, 2002; Zandi et al., 2002). Além disso, um grande número de trabalhos tem demonstrado uma associação entre polimorfismos em genes para algumas citocinas e outras moléculas inflamatórias e a doença de Alzheimer (Wyss-Coray, 2006). Por outro lado, foi demonstrado recentemente que a relação entre o processo inflamatório e a progressão da doença de

Alzheimer parece não ser tão simples quanto se imaginava. Wyss-Coray e colaboradores (2001) evidenciaram que alguns aspectos da resposta imunológica parecem ser importantes para a fagocitose dos fragmentos amilóides depositados no cérebro. Neste estudo, realizado em camundongos que expressam a APP humana, foi verificado que a produção de TGF $\beta$ 1 (*transforming growth factor  $\beta$ 1*) pelos astrócitos aumenta a atividade fagocítica da microglia, reduzindo significativamente a formação de placas amilóides e de emaranhados neurofibrilares nas regiões hipocampal e cortical do cérebro. Estes dados demonstram claramente que os mediadores envolvidos na resposta inflamatória podem apresentar papéis moduladores distintos durante a progressão da doença de Alzheimer.

As células da glia representam o principal tipo celular responsável pelo sistema de defesa no sistema nervoso central e parecem desempenhar papel central no processo inflamatório associado à doença de Alzheimer. Essas células se dividem em três grupos: os astrócitos, os oligodendrócitos e as células da micróglia. Os astrócitos são os mais abundantes e os maiores representantes das células gliais. Na substância cinzenta predominam os astrócitos protoplasmáticos, enquanto que os astrócitos fibrosos ocorrem na substância branca. Essas células são caracterizadas pela grande quantidade de processos fibrosos e pela alta concentração de proteínas do filamento intermediário (IF), como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Os oligodendrócitos são claramente distinguidos dos astrócitos por seu diâmetro de pericário com preponderância do núcleo em termos de volume celular. Na substância branca, os oligodendrócitos interfasciculares são responsáveis

pela formação da mielina no sistema nervoso central. Na substância cinzenta os oligodendrócitos são geralmente encontrados em associação com o pericário neuronal. Por fim, as microglias são as menores células gliais conhecidas, medindo o seu pericário entre 2 e 3  $\mu\text{m}$  e apresentando uma morfologia muito variável. Estas células são de origem mesodérmica. Quando se expõe a micróglia a estímulos capazes de gerar inflamação, esta se transforma do estado passivo para uma forma ativa, na qual tem capacidade de fagocitose semelhante ao macrófago (Bradford, 1985).

Em resposta ao dano neuronal, ocorre ativação de uma complexa resposta celular imune, envolvendo astrócitos e micróglia. Os astrócitos promovem atividades essenciais que protegem o tecido e sua função, além de promover o reparo neuronal, a produção de substratos energéticos e neurotrofinas. Esta população de células é capaz de reduzir a liberação do glutamato e de radicais livres, reestabelecer a barreira hematoencefálica e promover a neurovascularização e neurogênese (Liberto et al., 2004). Entretanto, a reação astrócita excessiva resulta na falência da reparação da barreira hematoencefálica, infiltração leucocitária, desmielização severa e morte de células oligodendrócitos (Faulkner et al., 2004). Similarmente, após ativação, a micróglia produz metabólitos que provocam a morte neuronal e impedem a neurogênese (Monje et al., 2003). Além disso, evidências sugerem que a deterioração ou disfunção da micróglia devido à progressão da idade poderia contribuir para o avanço de doenças neurodegenerativas (Streit, 2005).

Alterações em cada um destes tipos celulares foram documentadas através de estudos em pacientes acometidos pela doença de Alzheimer, bem como em culturas celulares e em modelos animais desta patologia. Além disso, inúmeros estudos têm demonstrado que a A $\beta$  é capaz de promover diversas modificações nas células da glia (McGeer e McGeer, 2002). Anormalidades na atividade dos astrócitos, incluindo disfunção no transporte de glutamato, perturbações na regulação do cálcio e a produção elevada de citocinas, podem contribuir para a disfunção sináptica e morte neuronal (Mattson, 2004). Além disso, durante a doença de Alzheimer observa-se um grande número de microglias em torno das placas amilóides e dos neurônios em degeneração. Acredita-se que essas células participem da produção de toxinas e citocinas inflamatórias que, por sua vez, contribuem para o processo neurodegenerativo (McGeer e McGeer, 2002). No presente estudo, a fim de determinar a possível ativação dos astrócitos pela administração i.c.v. do peptídeo A $\beta_{1-40}$ , foram avaliados os níveis de imunodeteção para a proteína GFAP no córtex e hipocampo. Os resultados do presente estudo fornecem evidências moleculares convincentes que confirmam e estendem os dados existentes na literatura, indicando que a injeção i.c.v. de peptídeos A $\beta$  promove ativação dos astrócitos (Yan et al., 2001). A ativação destas células foi verificada predominantemente no hipocampo, sendo observada um dia após o tratamento dos animais. Oito dias após o tratamento, o número de astrócitos detectados nos animais tratados com A $\beta_{1-40}$  foi similar aos dos animais controle. Além disso, nossos resultados indicam que o processo de ativação

dos astrócitos pela  $A\beta$  ocorre de maneira independente da via do  $TNF-\alpha$  e do NO, uma vez que o bloqueio farmacológico ou genético desta citocina ou da iNOS não apresentou qualquer efeito sobre a imunodeteção da GFAP na região hipocampal. Em conjunto com dados descritos na literatura, é possível sugerir que a ativação dos astrócitos é um dos primeiros eventos induzidos pela injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ , sendo que estas células podem estar envolvidas na liberação de substâncias tóxicas responsáveis pela disfunção sináptica e cognitiva, descritas anteriormente. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

O  $TNF-\alpha$  é uma citocina multifuncional que participa na modulação de uma grande quantidade de respostas celulares. No sistema nervoso central, o  $TNF-\alpha$ , através do TNFR1, induz dano das funções cognitivas e regula a morte neuronal, ambos importantes marcadores da doença de Alzheimer. Neste contexto, foi demonstrado recentemente que o  $TNF-\alpha$  participa da inibição do LTP pela  $A\beta$  - uma forma de plasticidade sináptica muito associada ao aprendizado e à memória (Wang et al., 2005). Evidências indicam que esse processo depende da ativação do receptor para o glutamato mGluR5 e da proteína quinase p38 MAPK (Wang et al. 2004, 2005). Além disso, a ativação do processo de apoptose é intensamente dependente da via de sinalização do  $TNF-\alpha$ . O TNFR1 contém um domínio de morte (*death domain*, DD) citoplasmático que se liga ao adaptador TRADD (*TNFR-associated DD*), que indiretamente ativa a cascata das caspases resultando em apoptose (Varfolomeev & Ashkenazi, 2004). De maneira interessante, foi sugerido recentemente que a  $A\beta_{1-40}$  pode-se ligar

diretamente ao TNFR1, resultando em apoptose neuronal (Li et al., 2005). Os dados do presente estudo demonstram que a A $\beta$ <sub>1-40</sub> induz a expressão do TNF- $\alpha$  no hipocampo e no córtex pré-frontal, ambas áreas essenciais para as funções cognitivas. Outro aspecto relevante demonstra que a inibição farmacológica e genética do TNF- $\alpha$  reduziu a perda sináptica e melhorou o desempenho das funções de aprendizado e memória nos animais tratados com A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Tais dados sugerem que o TNF- $\alpha$  apresenta um importante papel do desenvolvimento da doença de Alzheimer.

As cascatas de sinalização intracelular ativadas após a exposição ao TNF- $\alpha$  normalmente culminam em uma resposta nuclear caracterizada pela ativação de diversos fatores de transcrição, incluindo o NF- $\kappa$ B (Schreck et al., 1991; Beg et al., 1993) e o AP-1 (Lo & Cruz, 1995; Agnel & Karin, 1991). A via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B tem sido amplamente descrita nos últimos anos por diversos grupos de pesquisa, estando relacionada a uma grande variedade de patologias, tais como artrite reumatóide, asma, sepse, aterosclerose, diversos tipos de câncer e doenças neurodegenerativas (Barnes e Adcock, 1997; Barnes e Karin, 1997; Martin et al., 2000; Baldwin 2001; Karin et al., 2001; Tak e Firestein, 2001; Garg e Aggarwal, 2002; Li e Verma, 2002; Sun e Andersson, 2002; Adcock, 2003; Burke, 2003; Santoro et al., 2003). A ativação desse fator de transcrição pode ser observada em condições fisiológicas e em diversos estados patológicos e está associada diretamente ao controle da expressão de várias proteínas da resposta inflamatória, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e algumas proteínas de fase aguda (Blackwell et al., 1994;

Manning et al., 1995; Chen et al., 1995; Baldwin, 1996; Baichwal e Baeuerle, 1997; Tak e Firestein, 2001; Liu et al., 2003). NF- $\kappa$ B é o nome coletivo para fatores de transcrição diméricos, membros da família Rel, que incluem as proteínas RelA (p65), NF- $\kappa$ B1 (p50;p105), NF- $\kappa$ B2 (p52;p100), c-Rel e RelB (Verma et al., 1995; Ghosh et al., 1998). Cada uma dessas proteínas se caracteriza por apresentar uma seqüência amino-terminal altamente conservada de 300 aminoácidos, necessários à dimerização, à localização nuclear e à ligação do fator de transcrição ao DNA (Ghosh e Karin, 2002; Li e Verma, 2002). A maioria dos membros dessa família forma homo (com exceção do RelB) ou heterodímeros entre si, sendo a forma mais ativa do NF- $\kappa$ B, o heterodímero formado pelas subunidades p50 ou p52 com p65 (RelA). As proteínas p50 e p52 são formadas através de proteólise a partir dos precursores p105 e p100, respectivamente (Baeuerle e Baltimore, 1996).

Os fatores de transcrição da família do NF- $\kappa$ B são regulados através de interações com as proteínas inibitórias da família I $\kappa$ B, sendo as mais comuns a I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e a I $\kappa$ B $\epsilon$  (Ghosh et al., 1998). Com exceção dos linfócitos B, nos quais o NF- $\kappa$ B é encontrado de forma constitutiva no núcleo, os demais tipos celulares apresentam dímeros de NF- $\kappa$ B geralmente presentes no citoplasma das células associados às proteínas I $\kappa$ B. Essa associação garante que o sítio de localização nuclear do NF- $\kappa$ B permaneça mascarado evitando assim que este fator de transcrição migre para o núcleo (Rothwarf e Karin, 1999; Ghosh and Karin, 2002; Li and Verma, 2002; Karin et al., 2004). Está bem documentado que o I $\kappa$ B $\alpha$  regula a ativação transitória do NF- $\kappa$ B, enquanto que o I $\kappa$ B $\beta$  regula a ativação persistente desse fator de transcrição (May e

Ghosh, 1997). A degradação dessas proteínas e a consequente ativação desta via de sinalização ocorrem em resposta a estímulos celulares apropriados, sendo a maioria deles relacionado a patógenos ou estresse, tais como: citocinas pró-inflamatórias, infecção viral, ésteres de forbol, radiação ultravioleta, entre outros. A estimulação celular resulta na ativação do complexo de proteínas I $\kappa$ B quinases (IKKs), composto por três subunidades: IKK $\alpha$  (IKK1), IKK $\beta$  (IKK2) e IKK $\gamma$  (NEMO, IKKAP) (Karin e Ben-Neriah, 2000). As proteínas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  são as subunidades catalíticas, responsáveis pela fosforilação das proteínas I $\kappa$ B, enquanto que a IKK $\gamma$ /NEMO é a subunidade reguladora que controla a atividade do complexo IKK (Rothwarf e Karin, 1999). Uma vez ativado, o complexo IKK promove rápida fosforilação de resíduos de serina específicos, na porção amino-terminal das proteínas I $\kappa$ B (Ser 32 e Ser36 para I $\kappa$ B $\alpha$ ). As proteínas I $\kappa$ B fosforiladas são então poliubiquitinadas pela  $\beta$ -TRCP, tornando-as alvo para degradação pelo proteasoma 26S (Hershko and Ciechanover, 1992; Karin e Ben-Neriah, 2000; Ben-Neriah, 2002; Pickart, 2004). Como consequência da degradação das proteínas I $\kappa$ B, o NF- $\kappa$ B livre pode migrar para o núcleo, se associar a regiões do DNA que contenham porção  $\kappa$ B específica (5'GGG(A/G)NN(T/C)(T/C)CC3') e regular a transcrição de um grande número de genes (Bauerle e Baltimore, 1996; Barnes e Adcock, 1997; Barnes e Karin, 1997; Ghosh and Karin, 2002; Li and Verma, 2002; Karin et al., 2004).

Dímeros funcionais do NF- $\kappa$ B estão presentes em todos os tipos celulares do sistema nervoso central, incluindo neurônios, astrócitos, micróglia e oligodendrócitos. De maneira interessante, no cérebro, a atividade do NF-

$\kappa$ B parece estar relacionada tanto a funções fisiológicas quanto a alterações patológicas. Dados recentes obtidos em diferentes modelos experimentais sugerem que a estimulação sináptica basal é capaz de ativar o NF- $\kappa$ B, sendo este efeito mediado pela via de sinalização do glutamato e pelo aumento do cálcio intracelular (O'Neill & Kaltschmidt, 1997). Meffert e colaboradores (2003) demonstraram que a deleção gênica da subunidade p65 NF- $\kappa$ B resulta em déficits significativos de aprendizado, sugerindo a participação deste fator de transcrição nos processos cognitivos. Além disso, estudos em culturas celulares sugerem que a ativação do NF- $\kappa$ B pode estar relacionada ao processo de diferenciação neuronal, embora, os genes envolvidos neste processo ainda não tenham sido determinados (Kurata et al., 1993; Sheppard et al., 1995; Mattson e Camandola, 2001). Por outro lado, a maior parte dos estudos aponta o NF- $\kappa$ B como um importante mediador das respostas imunológica e inflamatória no cérebro. A ativação deste fator de transcrição tem sido implicada em diversas patologias neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer. Estudos *post-mortem* indicam que em cérebros de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer, a imunodeteção do NF- $\kappa$ B é elevada em neurônios e astrócitos próximos às placas amilóides (Teraï et al., 1996; Boissiere et al., 1997; Kaltschmidt et al., 1997). Dados recentes da literatura demonstram grande correlação entre o aumento da atividade do NF- $\kappa$ B e a expressão da COX-2 no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer (Lukiw et al., 1998). Além disso, dados da literatura indicam que a A $\beta$  induz a ativação do NF- $\kappa$ B em culturas celulares de neurônios e da glia (Akama et al., 1998; Bales et al., 2000; Mattson & Camandola, 2001; Kuner et

al., 1998; Ghribi et al., 2001). Corroborando com estes dados, no presente estudo foi demonstrado que a injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> promove a ativação do NF- $\kappa$ B no hipocampo e córtex pré-frontal. Ademais, nossos dados demonstram que bloqueio farmacológico com AbTNF- $\alpha$  resulta na redução da ativação do NF- $\kappa$ B pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>, indicando que esse fator de transcrição é modulado pela via do TNF- $\alpha$ .

As proteínas quinases constituem uma das mais importantes vias de sinalização intracelular nos animais superiores. Através da fosforilação de resíduos específicos, essas proteínas regulam a atividade enzimática, a interação entre diferentes grupos de moléculas, a localização celular e a propensão à degradação de seus substratos, que incluem outras proteínas quinases, fosfolipases, proteínas fosfatases, proteínas do citoesqueleto e fatores de transcrição (Levitzki e Gazit, 1995; King et al., 1997). A família das MAPKs constitui um grupo de proteínas quinases cuja função e regulação são altamente conservadas (Manning et al., 2002). Essas proteínas fosforilam resíduos de serina e em menor grau de treonina dos seus substratos e regulam várias atividades celulares, incluindo a expressão gênica, mitose, movimento celular, metabolismo e morte celular programada (Johnson e Lapadat, 2002). Em particular, três subfamílias de MAPK – ERK, p38 MAPK e JNK – têm sido amplamente caracterizadas. Quanto à última, até o presente momento, foram identificadas dez isoformas distintas de JNK, sendo estas derivadas dos genes *jnk1*, *jnk2* e *jnk3* (Gupta et al., 1996). A via de sinalização da JNK é um mecanismo para transmitir sinais da membrana celular para o núcleo. A ativação desta proteína ocorre pela fosforilação dos resíduos de

treonina ou de tirosina localizados próximo aos sítios de ligação do ATP e do substrato, em resposta a uma série de estímulos, dentre eles o estresse mecânico, citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ ), produtos bacterianos, além de estímulos químicos e térmicos, entre outros (Cohen, 1997; Garrington e Jonhson, 1999; Kyriakis e Avruch, 2001). Interessantemente, tem sido demonstrado que a ativação da JNK é essencial para a propagação do sinal desencadeado pelo TNF- $\alpha$  (Tournier et al., 2001). Dentre os alvos celulares da JNK, merecem destaque a proteína c-Jun, componente do fator de transcrição AP-1 e, as proteínas associadas ao processo de apoptose, incluindo o Bcl2 e a p53 (Manning e Davis, 2003). A ativação destas vias moleculares pela JNK tem sido relacionada a várias doenças inflamatórias e auto-imunes, dentre elas artrite reumatóide, esclerose múltipla, asma, psoríase e doenças neurodegenerativas em geral (p. ex. Alzheimer, Parkinson e Huntington).

No sistema nervoso central, as isoformas de JNK expressas em maior proporção são JNK3 $\alpha$ 1 e JNK1 $\alpha$ 1, sendo que a JNK3 está preferencialmente localizada nos neurônios piramidais das regiões CA1 e CA2 do hipocampo e em subregiões específicas do neocórtex (Kuan et al., 1999). Estudos de deleção gênica demonstraram que animais nocaute para *jnk1*, *jnk2* ou *jnk3* apresentam desenvolvimento normal (Yang et al., 1997; Kuan et al., 1999). Entretanto, animais com dupla deleção para *jnk1* e *jnk2* morrem prematuramente e exibem várias anormalidades cerebrais, que são atribuídas a falhas no processo de apoptose. Além disso, embora a deleção do *jnk3* não provoque morte prematura nos animais, distúrbios importantes

são detectados nos processos de indução e ativação da proteína c-Jun, bem como na ativação da apoptose neuronal (Bruckner et al., 2003). Quanto à doença de Alzheimer, uma série de evidências indica que a JNK participa efetivamente do processo de dano neuronal verificado nos pacientes (Manning e Davis, 2003). Estudos *in vivo* demonstram que o bloqueio da JNK3 reduz a ativação da proteína Fas, associada ao processo de apoptose e aumenta a resistência dos camundongos aos efeitos tóxicos da A $\beta$  (Morishima et al., 2001). Ainda, a análise *post-mortem* de cérebros de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer tem revelado a ativação das proteínas JNK1, 2 e 3 em áreas cerebrais com maior acúmulo de fragmentos amilóides (Zhu et al., 2001. Pei et al., 2001). A atividade da JNK também tem sido associada ao aumento na fosforilação da proteína *Tau* e ao conseqüente acúmulo de emaranhados neurofibrilares no interior dos neurônios (Reynolds et al., 1997). Por fim, recentemente foi sugerido que a via de sinalização da JNK regula o metabolismo da APP, podendo assim contribuir para o acúmulo de placas amilóides (Reynolds et al., 2001).

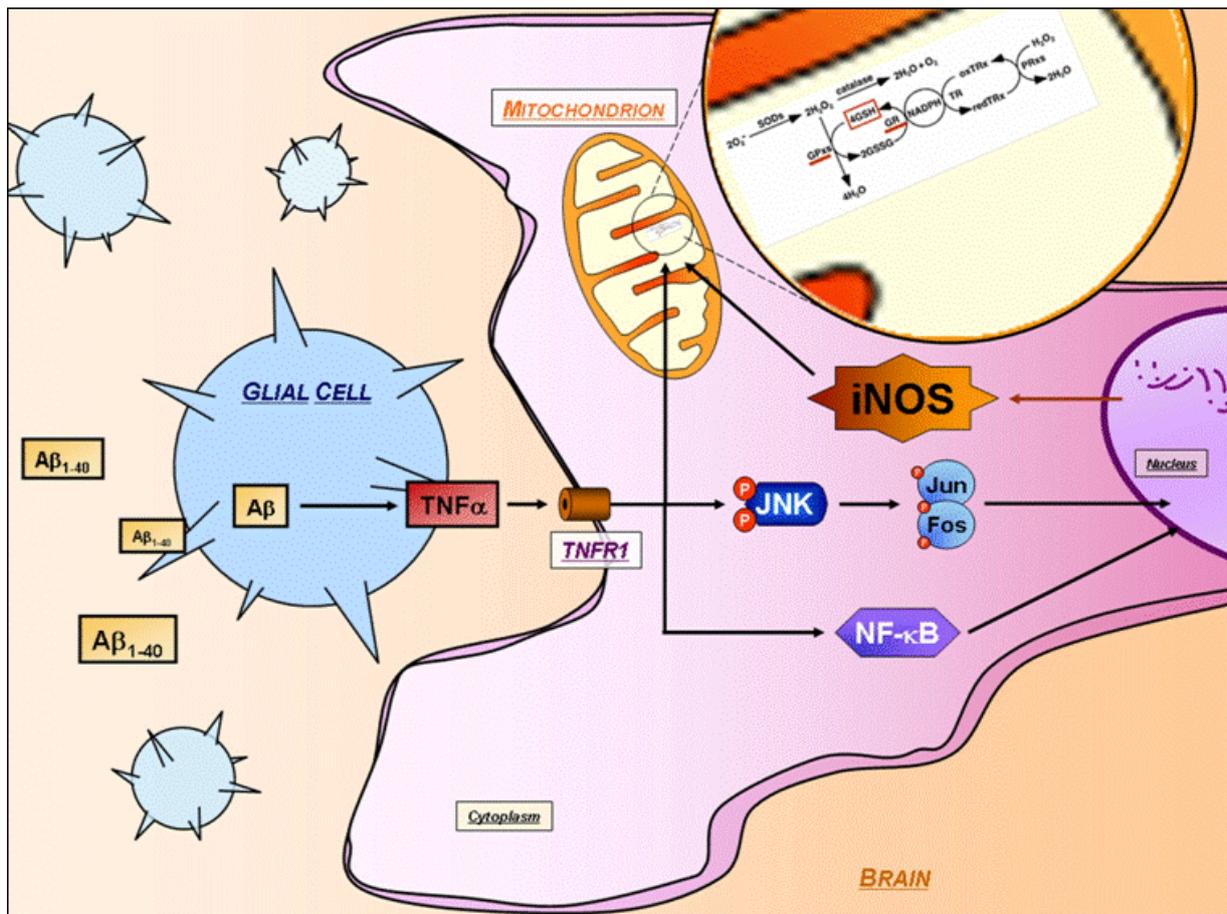
O fator de transcrição AP-1 é composto por homo ou heterodímeros de membros das famílias c-Jun e c-Fos e regula a expressão de um grande número de proteínas (Karin, 1995; Karin et al., 1998; Kaminska et al., 2000; Handel e Girgis, 2001). Em contraste com o NF- $\kappa$ B, o AP-1 está expresso nas células em baixas quantidades, tendo sua expressão aumentada em resposta a diferentes estímulos, tais como: ésteres de forbol, radiação ultravioleta, fatores de crescimento e citocinas (Karin et al., 1997; Karin 1995). Em resposta a estimulação ocorre aumento na expressão dos genes que

codificam as proteínas c-Jun e c-Fos, aumentando a síntese do fator de transcrição AP-1 (Karin, 1995). Evidências experimentais indicam o importante papel regulador exercido pela JNK na expressão dos genes para as proteínas que compõem o AP-1, aumentando a atividade de fatores de transcrição que controlam a expressão dessas proteínas, através de sua fosforilação (Deng e Karin, 1994; Gupta et al., 1996; Hazzalin et al., 1997; Musti et al., 1997; Read et al., 1997; Fuchs et al., 2000). De maneira interessante, é observada a ativação da JNK e da c-Jun em culturas de neurônios após a exposição ao peptídeo A $\beta$  e, a inibição desse processo atenua de forma significativa a toxicidade da A $\beta$  (Bozyczko-Coyne et al., 2001; Morishima et al., 2001; Troy et al., 2001). Além disso, a ativação da destas proteínas tem sido implicada na inibição do LTP mediada pela A $\beta$ , indicando um possível papel da via JNK/c-Jun nas funções cognitivas de aprendizado e memória (Wang et al., 2004). No presente estudo foi verificado que a injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> induziu rápida e sustentada ativação da JNK e de sua proteína alvo c-Jun. Além disso, nossos dados mostram claramente a associação entre estes dois eventos, uma vez que o inibidor seletivo para a JNK, SP600125, foi capaz de inibir a migração da c-Jun do citosol para o núcleo celular. Finalmente, através dos experimentos com o AbTNF- $\alpha$  também verificamos que a via JNK/c-Jun é modulada pela via de sinalização do TNF- $\alpha$ . Esses resultados são consistentes com dados prévios que demonstraram a ativação da JNK, através da detecção da JNK fosforilada (Shoji et al., 2000; Zhu et al., 2001) e da c-Jun (Anderson et al., 1994; 1996; Estus et al., 1997), em cérebros de pacientes com a doença de Alzheimer.

No sistema nervoso central, normalmente a iNOS está ausente em tecidos saudáveis. Todavia, após condições de estresse ou dano cerebral ocorre aumento em sua expressão e conseqüentemente na produção de NO, principalmente nos astrócitos, neurônios e células endoteliais. (Boje & Arora, 1992; Koprowski et al., 1993; Merrill et al., 1993; Schmidt & Walter, 1994). Por sua vez, o aumento na produção de NO induz dano e morte neuronal (Adamson et al., 1996). O mecanismo predominante pelo qual o NO gera a toxicidade neuronal ocorre em função da reação com o ânion superóxido e a conseqüente produção da substância citotóxica peroxinitrito (Beckman et al., 1990). Durante condições fisiológicas, as moléculas reativas do oxigênio são rapidamente eliminadas por enzimas antioxidantes, dentre elas a glutathione peroxidase (Thannickal & Fanburg, 2000). Contudo, durante condições patológicas, a produção excessiva e o conseqüente acúmulo de espécies reativas devido à limitação da atividade enzimática resultam em disfunção celular (Fiers et al., 1999). A expressão da iNOS e o aumento na produção de NO tem sido amplamente implicados na doença de Alzheimer. Neste sentido, foi demonstrado que tanto a expressão da iNOS, quanto a produção de peroxinitrito estão elevados nos cérebros de indivíduos acometidos por essa patologia (Smith et al., 1997; Hensley et al., 1998; Tohgi et al., 1999; Luth et al., 2002; Fernandez-Vizarra et al., 2004). Recentemente, foi sugerido que a deleção gênica da iNOS é capaz de proteger substancialmente os animais do efeito citotóxico gerado pela A $\beta$  (Nathan et al., 2005). Além disso, dados de experimentos de eletrofisiologia sugerem que a iNOS pode mediar parte dos efeitos deletérios sobre a cognição induzidos

pela A $\beta$  em roedores (Tran et al., 2001; Wang et al., 2004). Os resultados do presente estudo indicam que o aumento na expressão da iNOS induzida pela A $\beta_{1-40}$  é acompanhada pela redução no nível de glutathiona, sugerindo um possível aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo o NO. Além disso, a inibição da iNOS ou sua deleção gênica foram capazes de proteger os animais do dano no aprendizado e memória induzido pela A $\beta_{1-40}$ . Tal efeito protetor possivelmente está relacionado à redução na disfunção sináptica observada nos animais tratados com AG e nos *iNOS*<sup>-/-</sup>.

Embora se tenha conhecimento da importância do processo de transcrição para a expressão da iNOS, as vias de sinalização envolvidas nesse processo ainda não foram totalmente esclarecidas, principalmente no que se refere à indução mediada pela A $\beta$ . Até o momento, através dos estudos de clonagem e seqüenciamento foi verificada a existência de diferentes sítios de ligação para fatores de transcrição na região promotora para a iNOS no DNA, incluindo para o AP-1, NF- $\kappa$ B e o elemento de resposta ao TNF (Keinanen et al., 1999; Eberhardt et al., 1996). De forma relevante, os dados do presente estudo indicam que a expressão da iNOS induzida pela A $\beta_{1-40}$  é amplamente dependente da via de sinalização do TNF- $\alpha$ , envolvendo a ativação tanto da JNK/c-Jun quanto do NF- $\kappa$ B. Estes resultados estendem o conceito de que a iNOS é uma proteína modulada por mecanismos altamente especializados e sugerem uma possível seqüência de eventos que pode ser importante para o desenvolvimento da doença de Alzheimer.



*Figura 21 – Papel do TNF- $\alpha$  e da iNOS no dano neuronal induzido pela injeção i.c.v. da A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Administração i.c.v. da A $\beta$ <sub>1-40</sub> induz a expressão da citocina TNF- $\alpha$  que, por sua vez, promove a ativação das vias de sinalização intracelular JNK/c-Jun e NF- $\kappa$ B. Após sua ativação tanto o c-Jun quanto o NF- $\kappa$ B migram para o núcleo, onde se ligam ao DNA induzindo a expressão do mRNA e proteína iNOS. O aumento na produção de NO pela iNOS contribui para a alteração no estado redox das células do SNC. O acúmulo de substâncias tóxicas em áreas como o hipocampo e o córtex pré-frontal promovem dano sináptico que esta associada ao déficit cognitivo verificado na doença de Alzheimer.*

Nos últimos anos, vem crescendo o número trabalhos sugerindo o envolvimento do sistema caliceína-cininas na fisiopatologia da doença de Alzheimer. Tem sido demonstrado que a bradicinina (BK) tem sua produção

aumentada em condições consideradas fatores de risco para a doença de Alzheimer, como o derrame e o traumatismo craniano (Steranka et al., 1988). Áreas cerebrais que são acometidas nas fases iniciais da doença de Alzheimer, como o bulbo olfatório, a substância cinzenta periaquedutal e o córtex entorrinal, apresentam expressão aumentada de vários elementos do sistema caliceína-cininas, incluindo a própria BK,  $\alpha$ -globulinas (enzimas de síntese das cininas) e os receptores B<sub>2</sub> para cininas (Correa et al., 1979; Perry e Snyder, 1984; Raidoo e Bhoola, 1997; Chen et al., 2000). Além disso, cultura de células tratadas com a proteína A $\beta$  apresentaram aumento de três a quatro vezes na concentração de cininas (Wirth et al., 1999), sendo que a ativação do sistema caliceína-cininas e a liberação aumentada de BK parecem ser induzidas pela forma agregada da proteína A $\beta$  (Shibayama et al., 1999). No presente estudo, tanto o tratamento com o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub>, Hoe140, quanto a deleção gênica do receptor B<sub>2</sub> promoveu redução dos prejuízos cognitivos induzidos pela injeção i.c.v. do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos quando avaliados 7 ou 30 dias após o tratamento. Além disso, os dados de biologia molecular indicam que a expressão desse receptor não foi alterada nas estruturas hipocampal e cortical do cérebro pela administração do fragmento A $\beta$ <sub>1-40</sub>. De maneira importante, estes resultados representam a primeira evidência *in vivo* da participação do receptor B<sub>2</sub> para cininas nos efeitos tóxicos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Reforçando os nossos achados, Jong e colaboradores (2002) demonstraram a existência de modificações nos sítios de fosforilação do receptor B<sub>2</sub> em dois modelos celulares da doença de Alzheimer. Além disso,

estudos *in vitro* sugerem que a exposição da cultura de células do tipo PC12 à proteína A $\beta$  promove aumento na produção de inositol trifosfato (IP3) e elevação dos níveis de cálcio citosólico em resposta a estimulação com BK, sendo que estes efeitos parecem ser dependentes do aumento no número e na afinidade ao ligante dos receptores B<sub>2</sub> (Huang et al., 1998).

Embora no presente momento não seja possível determinar o exato mecanismo pelo qual o receptor B<sub>2</sub> para cininas é capaz de modular as alterações cognitivas induzidas pelo peptídeo A $\beta$ , algumas especulações podem ser formuladas. Racchi e colaboradores (1998) demonstraram que o tratamento de fibroblastos humanos com BK promove aumento na secreção da APP, sendo que este efeito é bloqueado pelo antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub>, Hoe140. Portanto, o receptor B<sub>2</sub> poderia estar regulando as primeiras fases da cascata da proteína A $\beta$ , o que explicaria o efeito preventivo apresentado pelo Hoe140 nos prejuízos cognitivos observados no presente estudo. Alternativamente, como já descrito anteriormente, a fosforilação aumentada da proteína *Tau* e o seu acúmulo na forma de emaranhados neurofibrilares são determinantes para a degeneração do citoesqueleto microtubular verificado no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer (Augustinack et al., 2002). Neste sentido, foi demonstrado recentemente que a ativação do receptor B<sub>2</sub> induz aumento na fosforilação da proteína *Tau* em fibroblastos de pacientes com a doença de Alzheimer, mas não em fibroblastos de indivíduos controles da mesma idade (Jong et al., 2003). Desta forma, a regulação da fosforilação da proteína *Tau* pode representar um mecanismo indireto pelo qual o receptor

B<sub>2</sub> para cininas regula os efeitos induzidos pela proteína A $\beta$ . Todavia, estudos adicionais são necessários para confirmar estas hipóteses.

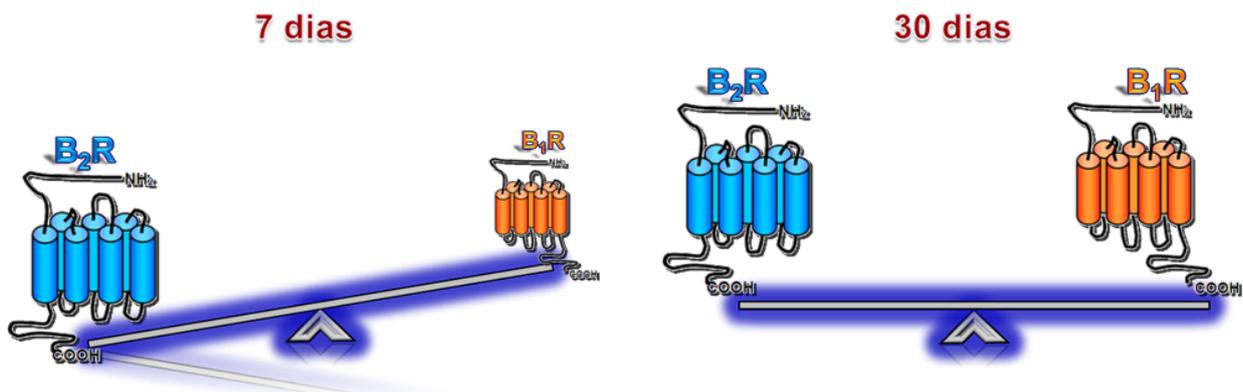
Apesar de ter sido o primeiro receptor para cininas caracterizado farmacologicamente, a relevância do receptor B<sub>1</sub> no controle de processos fisiopatológicos e o seu potencial como alvo terapêutico levaram muito tempo para serem reconhecidos, devido a suas características complexas de expressão e pela limitada atividade de seus antagonistas (Calixto et al., 2004). O receptor B<sub>1</sub> para cininas faz parte de uma complexa família de receptores, chamados de receptores indutíveis, que incluem vários outros membros, como os receptores para a interleucina-1 (IL-1), para o fator ativador de plaquetas (PAF) e para a progesterona (Donaldson et al., 1997). Isto significa que o receptor B<sub>1</sub> apresenta baixo padrão de expressão em condições normais, mas que pode apresentar sua transcrição e expressão induzidas em situações fisiológicas (p. ex. angiogênese) e principalmente em situações patológicas (p. ex. trauma tecidual e processos inflamatórios crônicos) (Marceau et al., 1998; Calixto et al., 2004). De maneira interessante, inúmeros estudos têm demonstrado que a expressão do receptor B<sub>1</sub> pode ser modulada pelo TNF- $\alpha$ , JNK, NF- $\kappa$ B e/ou NO (Calixto et al., 2004), o que sugere uma possível indução deste receptor para as cininas pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Para confirmar esta hipótese foi avaliado o efeito do tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> no padrão de expressão do receptor B<sub>1</sub> em diferentes áreas cerebrais. Como esperado, durante condições basais uma baixa expressão do receptor B<sub>1</sub> foi observada no hipocampo e córtex cerebral. Todavia, o tratamento com o fragmento A $\beta$ <sub>1-40</sub> promoveu o aumento sustentado da

expressão deste receptor, sendo este processo verificado um dia após o tratamento e permanecendo pelo menos até 30 dias após a injeção. Estes resultados sugerem uma possível participação dos receptores B<sub>1</sub> para as cininas nos efeitos tóxicos induzidos pela Aβ<sub>1-40</sub>. Estudos adicionais são necessários para verificar a relação entre as vias de sinalização descritas acima e o processo de indução do receptor B<sub>1</sub> pela Aβ. Posteriormente, com o uso de ferramentas farmacológicas e genéticas foi verificado o efeito do bloqueio dos receptores B<sub>1</sub> sobre os déficits de aprendizado e memória induzidos pela Aβ<sub>1-40</sub>. Desta forma, a deleção gênica do receptor B<sub>1</sub> ou o tratamento com o antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub>, a des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK, foram capazes de inibir parcialmente os prejuízos cognitivos observados nos estágios tardios, 30 dias após a administração da Aβ<sub>1-40</sub>. Entretanto, estas estratégias não foram capazes de prevenir ou reverter os prejuízos cognitivos observados nos estágios iniciais, 7 dias após a injeção do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. Em conjunto, estes dados indicam que independente do aumento antecipado na expressão do receptor B<sub>1</sub> no hipocampo e córtex, o bloqueio destes receptores não apresenta eficácia na redução dos efeitos cognitivos induzidos pela Aβ<sub>1-40</sub> no estágio inicial avaliado. Por outro lado, o progresso da patologia parece promover modificações moleculares que aumentam a importância deste receptor para as funções cognitivas, uma vez que tanto a deleção gênica quanto o bloqueio farmacológico foram capazes de reverter o dano induzido pela Aβ<sub>1-40</sub> 30 dias após o tratamento. Com base nestes resultados é possível sugerir que o aumento na expressão do receptor B<sub>1</sub> observada no estágio inicial parece estar relacionada a outros efeitos da

A $\beta$  que não foram avaliados no presente estudo. No estágio tardio, o papel dos receptores B<sub>1</sub> pode aumentar em importância no que concerne os prejuízos cognitivos induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>, sendo que este efeito pode ocorrer para compensar a redução do envolvimento dos receptores B<sub>2</sub> nestes processos, como sugerido pela redução do efeito inibitório do antagonista Hoe140 nos estudos comportamentais, 30 dias após a injeção i.c.v. Entretanto, estudos adicionais são necessários para melhor compreender a relação entre o receptor B<sub>1</sub> e a doença de Alzheimer.

Várias evidências indicam que a resposta inflamatória induzida pela A $\beta$  no sistema nervoso central envolve a liberação de diversos mediadores, tais como: citocinas pró-inflamatórias, NO, substâncias reativas do oxigênio e cininas. Estas, por sua vez, promovem a ativação de vias de sinalização intracelulares que contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer (Akiyama et al., 2000; Selkoe, 2002). No presente estudo foi demonstrado que a administração de uma única dose de A $\beta$ <sub>1-40</sub> promoveu a ativação da resposta inflamatória no sistema nervoso central, sendo que tal efeito parece contribuir para o declínio das funções cognitivas de aprendizado e memória. Os resultados apresentados indicam um processo de dano sináptico e ausência de apoptose. Tais evidências reforçam a idéia que a disfunção sináptica é um dos primeiros fenômenos na doença de Alzheimer e precede a morte celular (Selkoe, 2002). Além disso, através de ferramentas farmacológicas e moleculares foi claramente demonstrada relação entre a A $\beta$ , o TNF- $\alpha$ , a iNOS, o estresse oxidativo e o declínio cognitivo. Nossos dados sugerem uma seqüência de eventos, onde

o TNF- $\alpha$ , provavelmente através do TNFR1, exerce um papel fundamental na regulação da expressão da iNOS, das alterações oxidativas e do conseqüente dano cognitivo induzidos pela A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Finalmente, o presente estudo apresenta dados consistentes acerca da participação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas nos prejuízos cognitivos induzidos pela A $\beta$ .



*Figura 22 – Papel dos receptores para cininas no dano cognitivo induzido pela injeção i.c.v. da A $\beta$ <sub>1-40</sub>. A indução e manutenção do dano cognitivo verificado após a injeção de A $\beta$ <sub>1-40</sub> envolve exclusivamente a participação do receptor B<sub>2</sub> no período inicial do processo (até 7 dias). Após longo período do tratamento (30 dias) o dano cognitivo induzido pela A $\beta$ <sub>1-40</sub> envolve tanto o receptor B<sub>2</sub> quanto o receptor B<sub>1</sub> para as cininas.*

## **CONCLUSÃO**

Em conjunto, os dados do presente estudo sugerem que as vias de sinalização do TNF- $\alpha$ , da iNOS e das cininas parecem exercer importante papel no dano cognitivo observado nos primeiros estágios da doença de Alzheimer. Estudos adicionais que visem caracterizar possíveis substratos celulares para essas proteínas podem auxiliar no entendimento do papel que cada uma delas exerce, bem como, indicar alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos para intervenção da doença de Alzheimer em humanos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AHLUWALIA A, PERRETI M (1999) B<sub>1</sub> receptors as new inflammatory target. Could this B be the 1? *Trend in Pharmacol Sci* 20:100-104.

AKAMA KT, ALBANESE C, PESTELL RG, VAN ELDIK LJ (1998) Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NF-kappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5795-5800.

AKIYAMA H, ARAI T, KONDO H, TANNO E, HAGA C, IKEDA K (2000a) Cell mediators of inflammation in the Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14:S47-53.

AKIYAMA H, BARGER S, BARNUM S, BRADT B, BAUER J, COLE GM, COOPER NR, EIKELBOOM P, EMMERLING M, FIEBICH BL, FINCH CE, FRAUTSCHY S, GRIFFIN WS, HAMPEL H, HULL M, LANDRETH G, LUE L, MRAK R, MACKENZIE IR, MCGEER PL, O'BANION MK, PACHTER J, PASINETTI G, PLATA-SALAMAN C, ROGERS J, RYDEL R, SHEN Y, STREIT W, STROHMEYER R, TOOYOMA I, VAN MUISWINKEL FL, VEERHUIS R, WALKER D, WEBSTER S, WEGRZYNIAK B, WENK G, WYSS-CORAY T (2000b) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.

ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.

ANDERSON AJ, SU JH, COTMAN CW (1996) DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J Neurosci* 16:1710-1719.

ANGEL P, KARIN M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129-157.

AUGUSTINACK JC, SCHNEIDER A, MANDELKOW EM, HYMAN BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103:26-35.

BAEUERLE PA, BALTIMORE D (1996) NF- $\kappa$ B: ten years after. *Cell* 87:13-20.

BAICHWAL VR, BAEUERLE PA (1997) Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol* 7:R94-96.

BALDWIN AS (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683.

BARANANO DE, SNYDER SH (2001) Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10996-11002.

BARNES PJ, ADCOCK IM (1997) NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci* 18:46-50.

BARNES PJ, KARIN M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066-1071.

BARONE FC, ARVIN B, WHITE RF, MILLER A, WEBB CL, WILLETTE RN, LYSKO PG, FEUERSTEIN GZ (1997) Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28:1233-1244.

BAUD V, KARIN M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11: 372-377.

BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREEMAN BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.

BEG AA, FINCO TS, NANTERMET PV, BALDWIN ASJR (1993) Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 13:3301-3310.

BEN-NERIAH, Y (2002) Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol* 3:20-26.

BHOOLA KD, FIGUEROA CD, WORTHY K (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* 44:1-80.

BLACKWELL TS, HOLDEN EP, BLACKWELL TR, DELARCO JE, CHRISTMAN JW (1994) Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mediates neutrophilic alveolitis in rats: association with nuclear factor kappa B activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:464-472.

BLENNOW K, DE LEON MJ, ZETTERBERG H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403.

BLENNOW K, WILLIAN A (1992) Clinical heterogeneity of probable Alzheimer's disease. *Journal Geriatric Psychiatry Neurology* 2:211-228.

BLESSED G, TOMLINSON BE, ROTH M (1968) The association between quantitative measures of dementia and senile change in the cerebral grey matter elderly subjects. *British Journal of Psychiatry* 797-811.

BOGDAN C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.

BOZYCZKO-COYNE D, O'KANE TM, WU ZL, DOBRZANSKI P, MURTHY S, VAUGHT JL, SCOTT RW (2001) CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem* 77:849-863.

BRAAK H, BRAAK E (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 53:127–140.

BRADFORD HF (1985) Glial Cells: Mechanical and Functional Supporting Cells of the Nervous System. Cap. 2, p. 62-110, In: *Chem Neurobiol*. W. H. Freeman and Company, NY, USA.

BRUCKNER SR, TAMMARIELLO SP, KUAN CY, FLAVELL RA, RAKIC P, ESTUS S (2001) JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurochem* 78:298-303.

BUDSON AE, PRICE BH (2005) Memory dysfunction. *N Engl J Med* 352:692-699.

BUTTINI M, ORTH M, BELLOSTA S, AKEEFE H, PITAS RE, WYSS-CORAY T, MUCKE L, MAHLEY RW (1999) Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe<sup>-/-</sup>mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci* 19:4867-4880.

CALIXTO JB, CABRINI DA, FERREIRA J, CAMPOS MM (2000) Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87:1–5.

CALIXTO JB, MEDEIROS R, FERNANDES ES FERREIRA J, CABRINI DA, CAMPOS MM (2004) Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 143:803-818.

CAMPBELL BA, KRAUTER EF, WALLACE JE (1980) Animal models of aging: sensory-motor and cognitive function in the aged rat. Em: STEIN, D.G. (Ed.), *Psychobiology of Aging*. Elsevier, New York, NY, pp. 201–206.

CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumour. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3666-3670.

CAYATTE AJ, PALACINO JJ, HORTEN K, COHEN RA (1994) Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 14:753–759.

CHEN EY, EMERICH DF, BARTUS RT, KORDOWER JH (2000) B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 427:1–18.

CHEN F, KUHN DC, SUN SC, GAYDOS LJ, DEMERS LM (1995) Dependence and reversal of nitric oxide production on NF-kappa B in silica and lipopolysaccharide-induced macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 214:839-846.

CHEN G, GOEDDEL DV (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296:1634–1635.

CHRISTOPHERSON KS, BREDT D (1997) Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *Journal Clinical Investigation*, 100:2424-2429.

COHEN DM (1997) Mitogen-activated protein kinase cascades and the signaling of hyperosmotic stress to immediate early genes. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 117:291-9.

CORREA FM, INNIS RB, UHL GR, SNYDER SH (1979) Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1489-93.

CORREA FM, INNIS RB, UHL GR, SNYDER SH (1979) Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1489-1493.

COTMAN CW, BERCHTOLD NC (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25:295-301.

DENDORFER A, WOLFRUM S, DOMINIAK P (1999) Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *Jpn J Pharmacol* 79:403-426.

DENG T, KARIN M (1994) c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 371:171-175.

DEWACHTER L, VAN LEUVEN F (2002) Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease: the prospects. *Lancet Neurol* 1:409-416.

DICKSON DW (1997) Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging* 18:S21-S26.

DONALDSON LF, HANLEY MR, VILLABRANCA AC (1997) Inducible receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18:171-181.

EBERHARDT W, KUNZ D, HUMMEL R, PFEILSCHIFTER J (1996) Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 223:752-756.

FAULKNER JR et al. (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.

FILLIT H, DING WH, BUEE L, KALMAN J, ALTSTIEL L, LAWLOR B, WOLF-KLEIN G (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 129:318-320.

FLOOD JF, MORLEY JE, ROBERTS E (1991) Amnesic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid b protein from patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3363-3366.

FUCHS SY, TAPPIN I, RONAI Z (2000). Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 275:12560-12564.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-6.

GALIMBERTI D, SCHOONENBOOM N, SCARPINI E, SCHELTENS P (2003) Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* 53:547-548.

GARRINGTON TP, JOHNSON GL (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11:211-218.

GEARING M, MIRRA SS, HEDREEN JC, SUMI SM, HANSEN LA, HEYMAN A (1995) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 45:461-6.

GHOSH S, KARIN M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109:S81-S96.

GHOSH S, MAY MJ, KOPP EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.

GIOVANNELLI L, CASAMENTI F, SCALI C, BARTOLININ L, PEPEU G (1995) Differential effects of amyloid peptides b-(1-40) and b-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience* 66:781-792.

GLENNER GG, WONG CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.

GOEDERT M, SPILLANTINI MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-81.

GOMEZ-ISLA T, HOLLISTER R, WEST H, MUI S, GROWDON JH, PETERSEN RC, PARISI JE, HYMAN BT (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24.

GOODWIN JL, UEMURA E, CUNNICK JE (1995) Microglial release of nitric oxide by the synergistic action of  $\beta$ -amyloid and IFN- $\gamma$ . *Brain Res* 692:207-214.

GORELICK PB (2004) Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke* 35:2620-2622.

GOW AJ, FARKOUH CR, MUNSON DA, POSENCHEG H (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L262-L268.

GRUNDKE-IQBAL I, IQBAL K, TUNG YC, QUINLAN M, WISNIEWSKI HM, BINDER LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4913-4917.

GUPTA S, BARRETT T, WHITMARSH AJ, CAVANAGH J, SLUSS HK, DERIJARD B, DAVIS RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15:2760-2770.

GUZIK TJ, KORBUT R, ADAMEK-GUZIK T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469-487.

HAASS C (2004) Take five-BACE and the -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid-peptide generation. *EMBO J* 23:483-488.

HALLENBECK JM (2002) The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 8:1363-8.

HALLIWELL B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging* 18:685-716.

HANAFY KA, KRUMENACKER JS, MURAD F (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* 7:801-819.

HANDEL ML, GIRGIS L (2001) Transcription factors. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15:657-675.

HARDY J (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20:154-159.

HARDY JA, HIGGINS GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.

HARKANY T, MULER J, SASVAN M, ABRAHAM I, KONYA C, ZARANDI M, PENKE B, LUITEN PGM, NYAKAS C (1999) N-Methyl-d-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against b-amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 6:109-121.

HAZZALIN CA, CUENDA A, CANO E, COHEN P, MAHADEVAN LC (1997) Effects of the inhibition of p38/ERK MAP kinase on induction of five fos and jun genes by diverse stimuli. *Oncogene* 15:2321-2331.

HAZZARD DG (1991) Relevance of the rodent model to human aging studies. *Neurobiol Aging* 12:645-649.

HENDERSON V (1997) The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* 48:626-632.

HERSHKO A, CIECHANOVER A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61:761-807.

HESS JF (1997) Molecular pharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S.G. (Ed), *The kinin system*, London: Academic Press, p. 45-55.

HESS JF, BORKOWSKI JA, YOUNG GS, STRADER CD, RANSON RW (1992) Cloning and pharmacological characterization of human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Res Commun* 184:260-268.

HIBBS JB Jr, TAINTOR RR, VAVRIN Z, RACHLIN EM (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157:87-94.

HO L, PIERONI C, WINGER D, PUROHIT DP, AISEN PS, PASINETTI GM (1999) Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 57:295-303.

HSIAO K, CHAPMAN P, NILSEN S, ECKMAN C, HARIGAYA Y, YOUNKIN S, YANG F, COLE G (1996) Correlative memory deficits, Ab elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.

HUANG HS, OU HS, HSUEH SJ (1998) Amyloid  $\beta$ -peptide enhanced bradikinin-mediated inositol (1,4,5)-triphosphate formation and cytosolic free calcium. *Life Sci* 63:195-203.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2000) *Censo Demográfico, 2000*. Rio de Janeiro: IBGE.

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265-9.

IGNARRO LJ, NAPOLI C, LOSCALZO J (2002) Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. *Circ Res* 90:21-28.

IN'T VELD BA, RUITENBERG A, HOFMAN A, LAUNER LJ, VAN DUIJIN CM, STINJNEN T et al. (2001) Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risks of Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 345:1515-1521.

ISCHIROPOULOS H, AL-MEHDI AB (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 364:279-282.

JAVESGHANI D, HUSSAIN SN, SCHEIDEL J, QUINN MT, MAGDER SA (2003) Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs. *Shock* 19:486-93.

JHOO JH, KIM HC, NABESHIMA T, YAMADA K, SHIN EJ, JHOO WK, KIM W, KANG KS, JO SA, WOO JI (2004) Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav Brain Res* 155:185–96.

JOHN V, BECK JP, BIENKOWSKI MJ, SINHA S, HEINRIKSON RL (2003) Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors. *J Med Chem* 46:4625–4630.

JOHNSON GL, LAPADAT R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.

JONG YJ, FORD SR, SEEHRA K, MALAVE VB, BAENZIGER NL (2003) Alzheimer's disease skin fibroblasts selectively express a bradykinin signaling pathway mediating tau protein SER phosphorylation. *FASEB* 15:2319-2321.

KALTSCHMIDT B, UHEREK M, VOLK B, BAEUERLE PA, KALTSCHMIDT C (1997) Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2642-2647.

KAMINSKA B, PYRZYNSKA B, CIECHOMSKA I, WISNIEWSKA M (2000) Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60:395-402.

KARIN M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-16486.

KARIN M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-16486.

KARIN M, BEN-NERIAH Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.

KARIN M, LIU Z, ZANDI E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-246.

KARIN M, YAMAMOTO Y, WANG QM (2004) The IKK NF-kappaB system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3:17-26.

KING WG, MATTALIANO MD, CHAN TO, TSICHLIS PN, BRUGGE JS (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* 17:4406-4418.

KLEINERT H, SCHWARZ PM, FORSTERMANN U (2003) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384:1343-64.

KOBZIK L, REID MB, BREDET DS, STAMLER JS (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 8:546–548.

KOLESNICK RN, KRONKE M (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60:643–665.

KUAN CY, YANG DD, SAMANTA ROY DR, DAVIS RJ, RAKIC P, FLAVELL RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22:667-676.

KUHLENCORDT PJ, GYURKO R, HAN F, SCHERRER-CROSBIE M, ARETZ TH, HAJJAR R, PICARD MH, HUANG PL (2001) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischaemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 104:448–454.

KURATAA S, WAKABAYASHIC T, ITOB Y, MIWAC N, UENOC R, MARUNOUCHIB T, KURATAB N (1993) Human neuroblastoma cells produce the NF-kB-like HIV-1 transcription activator during differentiation. *FEBS Lett* 321:201–204.

KYRIAKIS JM, AVRUCH J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-869.

LAURSEN SE, BELKNAP JK (1986) Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods* 16:355–357.

LEVITZKI A, GAZIT A (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267:1782-1788.

LEVY JH (1996) The human inflammatory response. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:S31-S37.

LEVY-LAHAD E, WASCO W, POORKAJ P, ROMANO DM, OSHIMA J, PETTINGELL WH, YU CE, JONDRO PD, SCHMIDT SD, WANG K, et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973–977.

LI Q, VERMA IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-734.

LI R, YANG L, LINDHOLM K, KONISHI Y, YUE X, HAMPEL H, ZHANG D, SHEN Y (2004) Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J Neurosci* 24:1760-1771.

LIAO JK, HOMCY CJ (1993) The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. *J Clin Invest* 92:2168-2172.

LIBERTO CM et al (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092-1100.

LIEBMANN C (2001) Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol Chem* 382:49–55.

LIEBMANN C, BÖHMER F-D (2000) Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signalling. *Curr Med Chem* 7:911-943.

LIU W, REINMUTH N, STOELTZING O, PARIKH AA, TELLEZ C, WILLIAMS S, JUNG YD, FAN F, TAKEDA A, AKAGI M, BAR-ELI M, GALLICK GE, ELLIS LM (2003) Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res* 63:3632-6.

LIU ZG, HSU H, GOEDEL DV, KARIN M (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- $\kappa$ B activation prevents cell death. *Cell* 87:565-576.

LUCHSINGER JA, MAYEUX R (2004) Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Current Atherosclerosis Reports* 6:261-266.

LUKIW WJ, BAZAN NG (1998) Strong nuclear factor-B-DNA binding parallels cyclooxygenase-2 gene transcription in aging and in sporadic Alzheimer's disease superior temporal lobe neocortex. *J Neurosci Res* 53:583-592.

LUTH HJ, MUNCH G, ARENDT T (2002) Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res* 953:135-143.

MACMICKING JD, NATHAN C, HOM G, CHARTRAIN N, FLETCHER DS, TRUMBAUER M, STEVENS K XIE QW, SOKOL K, HUTCHINSON N, CHEN H, MUDGET JS (1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81:641-650.

MANNING AM, BELL FP, ROSENBLOOM CL, CHOSAY JG, SIMMONS CA, NORTHRUP JL, SHEBUSKI RJ, DUNN CJ, ANDERSON DC (1995) NF- $\kappa$ B is activated during acute inflammation in vivo in association with elevated endothelial cell adhesion molecule gene expression and leukocyte recruitment. *J Inflamm* 45:283-296.

MANNING AM, DAVIS RJ (2003) Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* 2:554-565.

MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T, SUDARSANAM S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.

MARCEAU F, HESS JF, BACHVAROV DR (1998) The B<sub>1</sub> receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50:357-386.

MARCHETTI L, KLEIN M, SCHLETT K, PFIZENMAIER K, EISEL UL (2004) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- $\kappa$ B pathway. *J Biol Chem* 279:32869-81.

MARLETTA MA (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78:927–930.

MARTIN R, HOETH M, HOFER-WARBINEK R, SCHMID JA (2000) The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:83-88.

MASLIAH E, ACHIM CL, GE N, DETERESA R, TERRY RD, WILEY CA (1992) Spectrum of human immunodeficiency virus-associated neocortical damage. *Ann Neurol* 32:321-329.

MATTSON MP (2003) Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med* 139:441–444.

MATTSON MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-9.

MATTSON MP, CAMANDOLA S (2001) NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* 107:247-54.

MAURICE T, LOCKHART BP, PRIVAT A (1996) Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 706:181–93.

MAY MJ, GHOSH S (1997) Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8:63-73.

MAYNE M, NI W, YAN HJ, XUE M, JOHNSTON JB, DEL BIGIO MR, PEELING J (2001) Power C. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor-alpha expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 32:240-8.

McDONALD MP, DAHL EE, OVERMIER YB, BANDYOPADHYAY S, BABCOCK D, CLEARY J (1996) Reversal of b-amyloid-induced retention deficit after exposure to training and state cues. *Neurobiol Learn Mem* 65:35-47.

McDONALD MP, DAHL EE, OVERMIER YB, MANTYH P, CLEARY J (1994) Effects of an exogenous b-amyloid peptide on retention for spatial learning. *Behav Neural Biol* 62:60-67.

MCEACHERN AE, SHELTON ER, BHAJTA S, OBERNOLT R, BACH C, ZUPPAN P, FUJISAKI J, ALDRISH RW, JARNAGIN K (1991) Expression cloning of rat B<sub>2</sub> bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7724-7728.

MCGEER PL, MCGEER EG (2002) Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol* 8:529–538.

MCGEER PL, SCHULZER M, MCGEER EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47:425–32.

McGEER PL, SCHULZER M, McGEER EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47:425-432.

MCKHANN G, DRACHMAN D, FOLSTEIN M, KATZMAN R, PRICE D, STADLAN EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under auspices of the department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34:939-944.

MCLAURIN J, CECAL R, KIERSTEAD ME, TIAN X, PHINNEY AL, MANEA M, FRENCH JE, LAMBERMON MH, DARABIE AA, BROWN ME, JANUS C, CHISHTI MA, HORNE P, WESTAWAY D, FRASER PE, MOUNT HT, PRZYBYLSKI M, ST GEORGE-HYSLOP P (2002) Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4–10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nature Med* 8:1263–1269.

MENKE JG, BOROWSKI JA, BIERILKO KK, MACNEIL T, DERRIC AW, SCHENECK KA, RANSOM RW, STRADER CD, LINEMEYER DL, HESS JF (1994) Expression of cloning of a human B<sub>1</sub> bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269:21583-21586.

MOLLER HJ, GRAEBER MB (1998) The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 248:111–22.

MONJE ML et al. (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.

MOORE, A.H.; O'BANION, K. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv. Drug Del. Rev.*, 54: 1627–1656, 2002.

MORISHIMA Y, GOTOH Y, ZIEG J, BARRETT T, TAKANO H, FLAVELL R, DAVIS RJ, SHIRASAKI Y, GREENBERG ME (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21:7551-7560.

MORRIS JC, RUBIN EH (1991) Clinical diagnosis and course of Alzheimer's disease. *Psychiatr Clin North Am* 14:223–236.

MORRIS RGM, GARRUD P, RAWLINS JNP, O'KEEFE J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.

MORTIMER JA, EBBITT B, JUN SP, FINCH MD (1992) Predictors of cognitive and functional progression in patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology* 42:1689-1696.

MOSS ML, JIN SL, MILLA ME, BICKETT DM, BURKHART W, CARTER HL, CHEN WJ, CLAY WC, DIDSBURY JR, HASSLER D, HOFFMAN CR, KOST TA, LAMBERT MH, LEESNITZER MA, MCCAULEY P, MCGEEHAN G, MITCHELL J, MOYER M, PAHEL G, ROCQUE W, OVERTON LK, SCHOENEN F, SEATON T, SU JL, BECHERER JD, et al (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-. *Nature* 385:733-736.

MOUNT C, DOWNTON C (2006) Alzheimer disease: progress or profit? *Nat Med* 12:780-4.

MURAD F, WALDMAN S, MOLINA C, BENNETT B, LEITMAN D (1987) Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res* 249:65-76.

MUSTI AM, TREIER M, BOHMANN D (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275:400-402.

NAGY Z, ESIRI MM, JOBST KA, MORRIS JH, KING EM, MCDONALD B, LITCHFIELD S, SMITH A, BARNETSON L, SMITH AD (1995) Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia* 6:21-31.

NAPOLI C, IGNARRO LJ (2001) Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 5:88-97.

NATHAN C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-64.

NATHAN C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.

NATHAN C, CALINGASAN N, NEZEZON J, DING A, LUCIA MS, LA PERLE K, FUORTES M, LIN M, EHRT S, KWON NS, CHEN J, VODOVOTZ Y, KIPIANI K, BEAL MF (2005) Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 202:1163-1169.

NAWASHIRO H, MARTIN D, HALLENBECK JM (1997) Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:229-32.

NITTA A, ITOH A, HASEGAWA T, NABESHIMA T (1994). b-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 170:63-66.

O'DONNELL VB, EISERICH JP, BLOODSWORTH A, CHUMLEY PH, KIRK M, BARNES S, DARLEY-USMAR VM, FREEMAN BA (1999) Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive species. *Methods Enzymol* 301:454-470.

O'NEILL LA, KALTSCHMIDT C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252-258.

PALLADINO MA, BAHJAT FR, THEODORAKIS EA, MOLDAWER LL (2003) Anti-TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov* 2:736-46.

PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-6.

PASINETTI GM, AISEN PS (1998) Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience*, 87:319-324.

PAUL AT, GOHIL VM, BHUTANI KK (2006) Modulating TNF- $\alpha$  signaling with natural products. *Drug Disc Today* 11:725-732.

PEI JJ, BRAAK E, BRAAK H, GRUNDKE-IQBAL I, IQBAL K, WINBLAD B, COWBURN RF (2001) Localization of active forms of c-Jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration. *J. Alzheimer's Dis* 3:41-48.

PEREZ C, ALBERT I, DEFAY K, ZACHARIADES N, GOODING L, KRIEGLER M (1990) A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63:251-258.

PERRY DC, SNYDER SH (1984) Identification of bradykinin in mammalian brain. *J Neurochem* 43:1072-1080.

PERRY DC, SNYDER SH (1984) Identification of bradykinin in mammalian brain. *J Neurochem* 43:1072-1080.

PESQUERO JB, ARAUJO RC, HEPPESTALL PA, STUCKY CL, SILVA JA JR, WALTHER T, OLIVEIRA SM, PESQUERO JL, PAIVA AC, CALIXTO JB, LEWIN GR, BADER M (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B<sub>1</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8140-5.

PESQUERO JB, PESQUERO JL, OLIVEIRA SM, ROSCHER AA, METZGER R, GANTEN D, BADER M (2004) Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B<sub>1</sub> receptor gene. *Biochem Biophys* 220:219-225.

PICKART CM (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116:181-190.

PREDIGER RDS, BATISTA LC, TAKAHASHI RN (2005) Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. *Neurobiol Aging* 26:957-964.

PREDIGER RDS, DE-MELLO N, TAKAHASHI RN (2006) Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. *Eur J Pharmacol* 531:176-182.

PROUD D, KAPLAN AP (1988) Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol* 6:49-83.

RACCHI M, IANNA P, BINETTI G, TRABUCCHI M, GOVONI S (1998) Bradykinin-induced amyloid precursor protein secretion: a protein kinase C-independent mechanism that is not altered in fibroblasts from patients with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem J* 330:1271-1275.

RAIDOO DM, BHOOLA KD (1998) Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther* 79:105-127.

RAND MJ (1992) Nitrogenic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19:147-169.

READ MA, WHITLEY MZ, GUPTA S, PIERCE JW, BEST J, DAVIS RJ, COLLINS T (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272:2753-61.

REGOLI D, GOBIEL F, NGUYEN QT, JUKIC D, SEONE PR, SALVINO JM, SAWUTZ DG (1994) Bradykinin receptor types and B2 subtypes. *Life Sci* 55:735-749.

REGOLI D, BARABÉ J, PARK WK (1977) Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol*, 55:855-867.

REYNOLDS CH, BETTS JC, BLACKSTOCK WP, NEBREDA AR, ANDERTON BH (2001) Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and p38, and glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem* 74:1587-1595.

REYNOLDS CH, UTON MA, GIBB GM, YATES A, ANDERTON BH (1997) Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase phosphorylates Tau protein. *J Neurochem* 68:1736-1744.

RITCHIE CW, BUSH AI, MACKINNON A, MACFARLANE S, MASTWYK M, MACGREGOR L, KIERS L, CHERNY R, LI QX, TAMMER A, CARRINGTON D, MAVROS C, VOLITAKIS I, XILINAS M, AMES D, DAVIS S, BEYREUTHER K, TANZI RE, MASTERS CL (2003) Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol* 60:1685-1691.

RITCHIE K, LOVESTONE S (2002) The dementias. *Lancet* 360:1759-1766.

ROBERDS SL, ANDERSON J, BASI G, BIENKOWSKI MJ, BRANSTETTER DG, CHEN KS, FREEDMAN SB, FRIGON NL, GAMES D, HU K, JOHNSON-WOOD K, KAPPENMAN KE, KAWABE TT, KOLA I, KUEHN R, LEE M, LIU W, MOTTER R, NICHOLS NF, POWER M, ROBERTSON DW, SCHENK D, SCHOOR M, SHOPP GM, SHUCK ME, SINHA S,

SVENSSON KA, TATSUNO G, TINTRUP H, WIJSMAN J, WRIGHT S, MCCONLOGUE L (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10:1317–1324.

ROGERS J, KIRBY LC, HEMPELMAN SR, BERRY DL, MCGEER PL, KASZNIAK AW, ZALINSKI J, COFIELD M, MANSUKHANI L, WILLSON P et al (1993) Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1609-1611.

ROMANELLI MF, MORRIS JC, ASHKIN K, COBEN LA (1990) Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures. *Arch Neurol* 47:847–850.

ROTHE J, LESSLAUER W, LOTSCHER H, LANG Y, KOEBEL P, KONTGEN F, ALTHAGE A, ZINKERNAGEL R, STEINMETZ M, BLUETHMANN H (1993) Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364:798.

ROTHWARF DM, KARIN M (1999) The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* RE1.

RUPNIAK NM, BOYCE S, WEBB JK, WILLIAMS AR, CARLSON EJ, HILL RG, BORKOWSKI JA, HESS JF (1997) Effects of the bradykinin B1 receptor antagonist des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]bradykinin and genetic disruption of the B2 receptor on nociception in rats and mice. *Pain* 71:89–97.

SANO M, ERNESTO C, THOMAS R, KLAUBER M, SCHAFFER K, GRUNDMAN M, WOODBURY P, GROWDON J, COTMAN C, PFEIFFER E, SCHNEIDER L, THAL L (1997) A controlled trial of selegiline, alphatocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 336:1216–1222.

SCHANSTRA JP, ARLIC C, MARIN-CASTANO MB, GIROLAMI J, BASCANDS J (1999) Renal bradykinin receptors: localisation, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role. *Int J Mol Med* 3:185-191.

SCHENK D, BARBOUR R, DUNN W, GORDON G, GRAJEDA H, GUIDO T, HU K, HUANG J, JOHNSON-WOOD K, KHAN K, KHOLODENKO D, LEE M, LIAO Z, LIEBERBURG I, MOTTER R, MUTTER L, SORIANO F, SHOPP G, VASQUEZ N, VANDEVERT C, WALKER S, WOGULIS M, YEDNOCK T, GAMES D, SEUBERT P (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173–177.

SEGUI B, CUVILLIER O, ADAM-KLAGES S, GARCIA V, MALAGARIE-CAZENAVE S, LEVEQUE S, CASPAR-BAUGUIL S, COUDERT J, SALVAYRE R, KRONKE M, LEVADE T (2001) Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest* 108:143–151.

SELKOE DJ (2002) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487–498.

- SHARMA JN, BUCHANAN WW (1994) Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp Toxicol Pathol* 46:421-433.
- SHEPPARD AM, MCQUILLAN JJ, IADEMARCO MF, DEAN DC (1995) Control of vascular cell adhesion molecule-1 gene promoter activity during neural differentiation. *J Biol Chem* 270:3710–3719.
- SHERRINGTON R, ROGAEV EI, LIANG Y, ROGAEVA EA, LEVESQUE G, IKEDA M, CHI H, LIN C, LI G, HOLMAN K, et al (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760.
- SHIBAYAMA Y, JOSEPH K, NAKAZAWA Y, GHEBREHIWET B, PEERSCHKE EIB, KAPLAN A (1999) Zinc-dependent activation of the plasma kinin-forming cascade by aggregated  $\beta$  amyloid protein. *Clin Immunol* 90:89-99.
- SMITH MA, RICHEY HARRIS PL, SAYRE LM, BECKMAN JS, PERRY G (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17:2653-2657.
- SRIRAM K, MATHESON JM, BENKOVIC SA, MILLER DB, LUSTER MI, O'CALLAGHAN JP (2006) Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- $\alpha$ . *FASEB J* 20:670-82.
- STAMLER JS, LAMAS S, FANG FC (2001) Nitrosylation, the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106:675–683.
- STERANKA LR, MANNING DC, DEHAAS CJ, FERKANY JW, BOROSKY SA, CONNOR JR, VAVREK RJ, STEWART JM, SNYDER SH (1998) Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3245–3249.
- STEWART JM, GERA L, YORK EJ, CHAN DC, BUNN P (1999) Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. *Immunopharmacology* 43:155-161.
- STREIT WJS (2005) Microglia and neuroprotection: implication for Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 48:234-239.
- TAK PP, FIRESTEIN GS (2001) NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107:7-11.
- TAKEUCHI H, JIN S, WANG J, ZHANG G, KAWANOKUCHI J, KUNO R, SONOBE Y, MIZUNO T, SUZUMURA A (2006) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem* 281:21362-8.

- TARKOWSKI E (2002) Cytokines in dementias. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1:193-200.
- TERAI K, MATSUO A, MCGEER PL (1996) Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res* 735:159-168.
- TERRANOVA JP, KAN JP, STORME JJ, PERREAUT P, LE FUR G, SOUBRIE P (1996) Administration of amyloid beta-peptides in the rat medial septum causes memory deficits: reversal by SR 57746A, a non-peptide neurotrophic compound. *Neurosci Lett* 213:79-82.
- THANNICKAL VJ, FANBURG BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005-L1028.
- TOMLINSON BE, BLESED G, ROTH M (1970) Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci* 1970 77:205-242.
- TOURNIER C, DONG C, TURNER TK, JONES SN, FLAVELL RA, DAVIS RJ (2001) MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 15:1419-1426.
- TRAN MH, YAMADA K, OLARIU A, MIZUNO M, REN XH, NABESHIMA T (2001) Amyloid beta-peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *FASEB J* 15:1407-1409.
- TROY CM, RABACCHI SA, XU Z, MARONEY AC, CONNORS TJ, SHELANSKI ML, GREENE LA (2001) beta-Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurochem* 77:157-164.
- TUPPO EE, ARIAS HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305.
- TURRIN NP, RIVEST S (2006) Tumor necrosis factor alpha but not interleukin 1 beta mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity. *J Neurosci* 26:143-51.
- UYLINGS HB, DE BRABANDER JM (2002) Neuronal changes in normal human aging and Alzheimer's disease. *Brain Cogn* 49:268-276.
- VALLANCE P, LEIPER J (2002) Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 1:939-950.
- VALLANCE P, LEIPER J (2002) Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 1:939-950.
- VAN DAM D, DE DEYN PP (2006) Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov* 5:956-970.

VARFOLOMEEV EE, ASHKENAZI A (2004) Tumor necrosis factor: an apoptosis JunKie? *Cell* 116:491-497.

VAVREK R, STEWART JM (1985) Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* 6:161-164.

VERMA IM, STEVENSON JK, SCHWARZ EM, VAN ANTWERP D, MIYAMOTO S (1995) Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9:2723-35.

WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.

WALSH DM, SELKOE DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193.

WANG Q, ROWAN MJ, ANWYL R (2004) Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci* 24:6049-6056.

WANG Q, WALSH DM, ROWAN MJ, SELKOE DJ, ANWYL R (2004) Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci* 24:3370-3378.

WANG Q, WU J, ROWAN MJ, ANWYL R (2005) Beta-amyloid inhibition of long-term potentiation is mediated via tumor necrosis factor. *Eur J Neurosci* 22:2827-2832.

WESTERMAN MA, COOPER-BLACKETER D, MARIASH A, KOTILINEK L, KAWARABAYASHI T, YOUNKIN LH, CARLSON GA, YOUNKIN SG, ASHE KH (2002) The relationship between Ab and memory in Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:1858-1867.

WIRTH KJ, FINK E, RUDOLPHI K, HEITSCH H, DEUTSCHLANDER N, WIEMER G (1999) Amyloid beta-(1-40) stimulates cyclic GMP production via release of kinins in primary cultured endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 382:27-33.

WU L, NOYAN ASHRAF MH, FACCI M, WANG R, PATERSON PG, FERRIE A, JUURLINK BH (2004) Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7094-9.

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

WYSS-CORAY T, LIN C, YAN F, YU GQ, ROHDE M, MCCONLOGUE L, MASLIAH E, MUCKE L (2001) TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med* 7:612-8.

XIE QW, KASHIWABARA Y, NATHAN C (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269:4705-8.

XIE QW, WHISNANT R, NATHAN C (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177:1779-84.

YAN JJ, CHO JY, KIM HS, KIM KL, JUNG JS, HUH SO, SUH HW, KIM YH, SONG DK (2001) Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br J Pharmacol* 133:89-96.

YANG DD, KUAN CY, WHITMARSH AJ, RINCON M, ZHENG TS, DAVIS RJ, RAKIC P, FLAVELL RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865-870.

ZANDI PP, ANTHONY JC, HAYDEN KM, MEHTA K, MAYER L, BREITNER JC (2002) Cache County Study Investigators. Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study. *Neurology* 59:880-886.

ZHU X, RAINA AK, ROTTKAMP CA, ALIEV G, PERRY G, BOUX H, SMITH MA (2001) Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 76:435-441.