

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PAULA MARIA QUAGLIO BELLOZI

**Efeito de um inibidor dual da enzima fosfatidilinositol-3-quinase
(PI3K) e do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) nas
alterações patológicas induzidas por peptídeo β -amilóide 1-42 *in*
*vivo e in vitro***

BELO HORIZONTE

2014

PAULA MARIA QUAGLIO BELLOZI

**Efeito de um inibidor dual da enzima fosfatidilinositol-3-quinase
(PI3K) e do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) nas
alterações patológicas induzidas por peptídeo β -amilóide 1-42 *in
vivo e in vitro***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Helton José Reis

BELO HORIZONTE

2014

043 Bellozi, Paula Maria Quaglio.
Efeito de um inibidor dual da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) nas alterações patológicas induzidas por peptídeo β -amilóide 1-42 in vivo e in vitro [manuscrito] / Paula Maria Quaglio Bellozi. - 2014.

94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. Co-orientador: Helton José Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

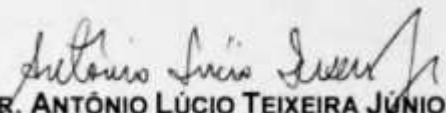
1. Alzheimer, Doença de - Teses. 2. Proteína beta-amilóide - Teses. 3. Fosfatidilinositol-3-quinase. 4. Proteína quinase B - Teses. 5. Alvo da rapamicina em mamíferos. 6. Fisiologia - Teses. I. Oliveira, Antônio Pinheiro de. II. Reis, Helton José. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

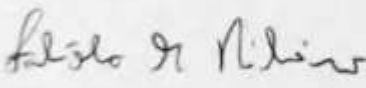
CDU: 612

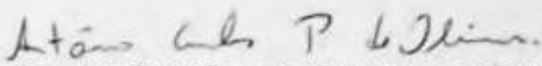
**"EFEITO DE UM INIBIDOR DUAL DA ENZIMA
FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASE (PI3K) E DO ALVO DA
RAPAMICINA EM MAMÍFEROS (MTOR) NAS ALTERAÇÕES
PATOLÓGICAS INDUZIDAS POR PEPTÍDEO β -AMILÓIDE 1-42 IN
VIVO E IN VITRO"**

PAULA MARIA QUAGLIO BELLOZI

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 01 de abril de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROF. DR. ANTÔNIO LÚCIO TEIXEIRA JÚNIOR
FM/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DR. FABIOLA MARA RIBEIRO
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 01 de abril de 2014

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – EDITAL
03/2013 - PPM-00372-13;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Universal
14/2013 - processo 479254/2013-3;

Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) / UFMG – Programa de Auxílio para a Pesquisa
dos Recém-Doutores.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades que coloca em minha vida.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, por ter me acolhido no laboratório de neurofarmacologia, ter me orientado desde o primeiro momento, me ensinado com paciência e me guiado no caminho da pós-graduação.

Ao professor Dr. Helton José Reis, por ter me aceitado como aluna, e me auxiliado durante a execução do meu mestrado.

À professora Dra. Fabíola Mara Ribeiro e à sua aluna MSc. Juliana Guimarães Dória, por ter disponibilizado seu laboratório e ter realizado alguns experimentos em colaboração.

Ao professor Dr. Antônio Lúcio Teixeira e às suas alunas Dra. Alline Cristina Campos e Dra. Érica Leandro Marciano Vieira por seus ensinamentos e por tornar possível a realização de vários experimentos de minha dissertação.

Ao Laboratório de Fisiologia Endócrina e Renal, por ter possibilitado a utilização do criostato.

À banca examinadora, por se disponibilizar para avaliação de meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial à Isabel e à Soraya, pela amizade, colaboração, suporte e paciência.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia, em especial aos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, pelos momentos compartilhados.

Ao meu pai, meu exemplo, por sempre me apoiar e dar suporte em minhas escolhas, estando presente em todos os momentos e por ter permitido que esse momento se concretizasse.

À minha mãe, pela amizade e por sempre me escutar e procurar uma solução para todos os meus problemas.

Ao Hugo, que esteve do meu lado suportando as crises durante meu mestrado e me dando força para seguir em frente.

E às agências de fomento CNPq e FAPEMIG, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

RESUMO

Introdução: A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, sendo a principal forma de demência. O principal sintoma é déficit cognitivo, especialmente a perda de memória e dificuldade de aprendizado, e os fármacos utilizados atualmente no tratamento não retardam a progressão da doença. Na DA, observa-se morte neuronal, neuroinflamação e alteração da produção de fatores neurotróficos. A via PI3K/ Akt/ mTOR é importante para a regulação do metabolismo, crescimento e sobrevivência celular, e estudos indicam que uma hiperativação da via pode ser observada na DA. Dessa forma, este estudo investiga os efeitos do tratamento com um inibidor dual de PI3K e mTOR, o NVP-BEZ235 em modelo murino de DA e em cultura de neurônios hipocâmpais estimulados com peptídeo β -amiloide.

Metodologia: Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos C57Bl/6 machos, que foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para injeção intra-hipocâmpal de 400 pmol de β -amilóide 1-42 em um volume de 0,5 μ L ou PBS. Os animais foram tratados por 8 dias com NVP-BEZ235 25 mg/Kg, rivastigmina 0,3 mg/Kg ou seus respectivos veículos, e submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos. Posteriormente, foi realizada perfusão intracardíaca para obtenção dos cortes cerebrais de hipocampo, ou a retirada do hipocampo a fresco. Os cortes de hipocampo foram marcados pela técnica de NISSL, para verificar a viabilidade celular, ou de Fluoro-Jade® C, para avaliar a morte neuronal. Os hipocâmpos retirados a fresco foram processados para determinação dos fatores neurotróficos, BDNF e NGF, bem como dos mediadores inflamatórios, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A. Para os experimentos *in vitro*, foi preparada a cultura de neurônios hipocâmpais de camundongos C57Bl/6 recém-nascidos. Foi adicionado o

peptídeo β -amilóide ou seu veículo, realizado o tratamento com memantina ou NVP-BEZ235 20 ou 100 μ M, e o ensaio de morte celular. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5 e expressos em média \pm EPM ($P < 0,05$). **Resultados:** Os camundongos que receberam β -amilóide apresentaram comprometimento da memória, revertido significativamente pelo NVP-BEZ235. Houve uma tendência ao aumento de morte neuronal em CA1, giro denteado e CA3 do hipocampo dos animais tratados com β -amilóide, efeito revertido pelo inibidor de PI3K e mTOR. Nas culturas, o peptídeo também provocou morte neuronal, que foi prevenida significativamente por memantina e NVP-BEZ235. Não houve alterações na expressão de BDNF, NGF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-17A, tanto no hipocampo ipsilateral quando no contralateral. Entretanto, no hipocampo ipsilateral dos animais tratados com NVP-BEZ235, há um aumento de IL-6 ($p=0,079$) e TNF- α ($p=0,056$), bem como um aumento significativo na expressão de IL-10. **Conclusões:** A β -amilóide induz alterações cognitivas e um aumento de morte neuronal *in vitro*, que podem ser revertidos ou prevenidos pelo tratamento com NVP-BEZ235. Além disso, *in vivo*, o fármaco parece melhorar a sobrevivência neuronal, e altera a expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Desta forma, o mecanismo pelo qual o NVP-BEZ235 melhora o aspecto cognitivo dos animais pode estar relacionado à redução da morte neuronal, além da alteração na produção de citocinas que estão envolvidas em memória.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, PI3K/ Akt/ mTOR, NVP-BEZ235, β -amilóide.

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease, which is the main cause of dementia. Its main symptom is the cognitive deficit, specially memory loss and learning disability, and the current therapy do not stop disease progression. There is neuronal death, neuroinflammation and changes in neurotrophins production in AD. The PI3K/ Akt/ mTOR pathway is involved in cellular metabolism, growth and survival, and it seems to be overactivated in AD. Therefore, the aim of the present study is to investigate the effects of the treatment with a dual PI3K and mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, in a murine model of AD and hippocampal neuronal cultures stimulated with amyloid- β . . **Methods:** Male C57Bl/6 mice were submitted to perform stereotactic surgery to intra-hippocampal injection of 400 pmol of amyloid- β 1-42 in a volume of 0.5 μ l or PBS. Animals were treated 8 days with NVP-BEZ235 25 mg/Kg, rivastigmine 0,3 mg/Kg or their vehicles, and then submitted to object recognition task. Following that, animals were submitted to intracardiac perfusion in order to obtain hippocampal cerebral slices, or their cerebral tissues were removed. The slices were stained with NISSL, to access cellular viability, or Fluoro-Jade[®] C to access neuronal death. The hippocampus were processed in order to measure neurotrophic factors BDNF and NGF levels, as well as inflammatory mediators IL-1 β IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-17A levels. In *in vitro* experiments, hippocampal neuronal cultures were prepared from newborn C57Bl/6 mice. Amyloid- β or its vehicle were added to the cultures and the treatment was done with memantine or NVP-BEZ235 20 or 100 μ M, to access the neuronal death assay. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism 5 and expressed as mean \pm SEM (P<0,05). **Results:** Mice that received amyloid- β revealed memory loss,

significantly reversed with NVP-BEZ235. There was a tendency of neuronal death increase in CA1, dentate gyrus and CA3 of hippocampus in animals receiving amyloid- β , which was reversed with the PI3K and mTOR inhibitor. In cultures, there was a neuronal death following treatment with amyloid- β , which was also significantly prevented with memantine and NVP-BEZ235. No difference was observed in the levels of BDNF, NGF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IFN- γ and IL-17A in both ipsilateral and contralateral hippocampus. However, there was an increase in IL-6 ($p=0,079$) and TNF- α ($p=0,056$) levels in ipsilateral hippocampus of mice treated with NVP-BEZ235, as well a significant increase in IL-10. **Conclusions:** Amyloid- β induces cognitive changes and neuronal death *in vitro*, which can be reversed or prevented by NVP-BEZ235 treatment. Furthermore, the drug seems to improve neuronal survival and change pro- and anti-inflammatory cytokines levels. Thus, the mechanism by which the drug improves cognitive parameters might be related to neuronal death decrease and changes in the production of cytokines involved in memory.

Keywords: Alzheimer`s Disease, PI3K/ Akt/ mTOR, NVP-BEZ235, amyloid- β .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação do peptídeo β -amilóide e hiperfosforilação da tau.

Figura 2: Fármacos Utilizados no tratamento da DA.

Figura 3: Representação esquemática da sinalização da via PI3K/ Akt/ mTOR.

Figura 4: Estrutura química do NVP-BEZ235.

Figura 5: Figura ilustrativa das etapas da tarefa de reconhecimento de objetos.

Figura 6: Princípio do ensaio de teste de viabilidade celular. Calceína-AM emitindo de fluorescência verde ao longo do corpo celular das células vivas (A) e homodímero de etídeo-1 emitindo fluorescência vermelha do núcleo das células mortas (B).

Figura 7: Massa corporal dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=13), β -amilóide + Veículo (n=13) e β -amilóide + Rivastigmina (n=13) ao longo dos dias de tratamento. No dia 1 os animais foram pesados antes da administração do tratamento e da cirurgia estereotáxica. Foi realizada ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.

Figura 8: Massa corporal dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=11), β -amilóide + Veículo (n=13) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=13). No dia 1 os animais foram pesados antes da administração do tratamento e da cirurgia estereotáxica. Foi realizada ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.

Figura 9: Índice de reconhecimento dos objetos (%) (A) e distância percorrida (B) pelos animais dos grupos PBS + Veículo (n = 8), β -amilóide + Veículo (n = 7) e β -amilóide + Rivastigmina (n = 8). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 10: Índice de reconhecimento dos objetos (%) (A) e distância percorrida (B) pelos animais dos grupos PBS + Veículo (n = 10), β -amilóide + Veículo (n = 10) e β -

amilóide + NVP-BEZ235 (n = 7). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. *p<0,05; **p<0,01.

Figura 11: Marcação de neurônios hipocâmpais com Violeta de Cresila (A) e quantificação da densidade celular em diferentes regiões do hipocampo ipsilateral: CA1 (B), Giro Denteado (C) e CA3 (D) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=4), β -amilóide + Veículo (n=5) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. *p<0,05. Fotografias com aumento de 10 vezes; destaque de CA1 com aumento de 20 vezes.

Figura 12: Marcação de neurônios hipocâmpais com FJC (A) e quantificação do número de células em diferentes regiões do hipocampo ipsilateral: CA1 (B), Giro Denteado (C) e CA3 (D) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=4), β -amilóide + Veículo (n=5) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=4). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. Fotografias com aumento de 10 vezes.

Figura 13: Dose vs resposta de morte celular (%) induzida por β -amilóide em cultura de neurônios nas concentrações de 0,33; 3,3 e 10 μ M. Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett. *p<0,05; ***p<0,001.

Figura 14: Marcação de células mortas com homodímero de etídeo-1 (em vermelho) e de células viáveis com calceína-AM (em verde) em culturas de neurônios hipocâmpais submetidas a diferentes tratamentos (A) e quantificação da morte celular (%) nos grupos sem β -amilóide: basal (n = 8), memantina 30 μ M (n = 3), NVP-BEZ235 20 μ M (n = 4) e NVP-BEZ235 100 μ M (n = 4); e com β -amilóide: β -amilóide (n = 7), memantina 30 μ M (n = 4), NVP-BEZ235 20 μ M (n = 4) e NVP-BEZ235 100 μ M (n = 4) (B). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 15: Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=5), β -amilóide + Veículo (n=5) e β -amilóide + Rivastigmina (n=5). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 16: Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 17: Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=5), β -amilóide + Veículo (n=5) e β -amilóide + Rivastigmina (n=5). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 18: Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 19: Níveis de IL-1 β (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 20: Níveis de IL-2 (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 21: Níveis de IL-4 (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 22: Níveis de IFN- γ (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 23: Níveis de IL-17A (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 24: Níveis de IL-6 (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 25: Níveis de TNF- α (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 26: Níveis de IL-10 (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. *p<0,05; **p<0,01.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inibidores da Colinesterase Utilizados no tratamento da DA

Tabela 2: Protocolo Experimental

LISTA DE ABREVIATURAS

A β ₁₋₄₂: β -amilóide 1-42

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

Akt: Proteína quinase B

ANOVA: Análise de variância

APP: Proteína precursora de amilóide

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA: Soroalbumina bovina

BuChE: Butirilcolinesterase

CA1 e CA3: Corno de Ammon - regiões 1 e 3

CBA: *Cytometric Bead Array*

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COX: Ciclo-oxigenase

CSF: Líquido Cerebroespinal

DA: Doença de Alzheimer

EDTA: Ácido etil-diamino-tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunossorvente ligado à enzima)

EPM: Erro Padrão da Média

EtOH: Etanol

FJC: Fluoro-Jade® C

GAP: Proteína ativadora de GTPase

i.c.v.: Intracerebroventricular

IFN- γ : Interferon gamma

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

i.p.: Intra-peritoneal

KMnO₄: Permanganato de Potássio

LPS: Lipopolissacarídeo

LTD: Depressão de longa duração

LTP: Potenciação de longa duração

mPGES: Prostaglandina E Sintase microsomal

mTOR: Alvo da rapamicina em mamíferos

MWM: *Morris Water Maze* (Labirinto Aquático de Morris)

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

NGF: Fator neurotrófico de crescimento

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMP: 1-metil 2-pirrolidona

OA: Objeto antigo

ON: Objeto novo

PBS: Tampão fosfato em salina

PEG: Polietilenoglicol

PG: Prostaglandina

PFA: Paraformaldeído

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato

PMSF: Fenilmetilsulfonila

PS: Presinilina

SAMP: *Senescence-accelerated mouse prone* (modelos animal com predisposição a senescência acelerada)

SNC: Sistema Nervoso Central

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

TRO: Teste de Reconhecimento de Objetos

TSC: Complexo da Esclerose Tuberosa

v.o.: Via Oral

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Doença de Alzheimer.....	21
1.2 Tratamento da Doença de Alzheimer.....	28
1.3 Modelos animais de Doença de Alzheimer.....	30
1.4 Inflamação na Doença de Alzheimer.....	33
1.5 Papel da via PI3K/ Akt/ mTOR na Doença de Alzheimer.....	36
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos Específicos.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 Animais.....	43
3.2 Drogas.....	43
3.3 Cirurgia estereotáxica e microinjeção intrahipocampal de β-amilóide 1-42.....	43
3.4 Protocolo experimental.....	44
3.5 Avaliação da memória através da Tarefa de Reconhecimento de Objetos.....	45
3.6 Medidas dos níveis de fatores neurotróficos e citocinas no	

hipocampo.....	46
3.7 Perfusão intracardíaca e preparo dos cérebros para técnicas histológicas.....	47
3.8 Marcação com violeta de cresila para avaliação de viabilidade celular.....	48
3.9 Marcação com Fluoro-Jade® C para avaliação de morte neuronal.....	48
3.10 Cultura primária de neurônios hipocampais.....	49
3.11 Ensaio de morte celular.....	50
3.12 Análise Estatística.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1 Massa dos animais ao longo dos dias de tratamento.....	52
4.2 Avaliação da memória através da TRO e distância percorrida pelos animais.....	53
4.3 Quantificação da densidade de células marcadas com violeta de cresila.....	55
4.4 Quantificação de células marcadas com Fluoro-Jade® C.....	56
4.5 Morte celular induzida em culturas de neurônios hipocampais....	58
4.6 Medida dos níveis dos fatores neurotróficos BDNF e NGF.....	60
4.7 Medida dos níveis das citocinas IL-1 β IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A.....	62
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) foi primeiramente descrita em 1906, pelo Dr. Alois Alzheimer, como uma doença peculiar. O médico alemão descreveu o caso de uma paciente com perda acentuada de memória, dificuldade de aprendizado e alterações psicológicas, como delírios de que poderia ser assassinada e o fato de esconder objetos. Na autópsia da paciente, o médico identificou uma redução do volume cerebral e depósitos anormais em torno de células nervosas. Em 1910 a patologia foi nomeada como Doença de Alzheimer (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

Demência é um termo utilizado para caracterizar um declínio nas habilidades intelectuais que interfiram na vida social (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014). A DA é a principal causa de demência que acomete a população idosa, com prevalência estimada em mais de 35 milhões de pessoas, e estima-se que esse número deve dobrar a cada 20 anos, prevendo um número maior que 115 milhões de casos em 2050 (GRIMM et al., 2013; O'NEILL, 2013).

A DA é a uma doença neurodegenerativa associada com o comprometimento gradual da memória (HAJ et al., 2013), sendo o envelhecimento o principal fator de risco associado. Com exceção de algumas raras formas autossômicas dominantes da doença e da herança genética dos alelos ApoE4 como fator de alto risco, a sua causa original ainda não foi elucidada (O'NEILL, 2013).

Atualmente, o diagnóstico da DA se baseia na avaliação dos pacientes através dos critérios estabelecidos pelos órgãos *National Institute of Aging* e *Alzheimer's Association*, e revisados em 2011. As entidades também estabeleceram,

em 2012, novos critérios para auxiliar no diagnóstico. Esses critérios descrevem três estágios da DA: (1) DA pré-clínica, (2) déficit cognitivo intermediário devido à DA e (3) demência devido à DA. A presença de alterações cerebrais na ausência de sintomas caracteriza o estágio 1; no estágio 2 os sintomas começam a aparecer, mas os pacientes são capazes de executar tarefas cotidianas; e no estágio 3, além dos sintomas característicos os indivíduos possuem dificuldade de executar tarefas simples do dia-a-dia (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014). Para diferenciar a DA de outras doenças, são necessários outros tipos de exames complementares, que não se baseiam apenas na avaliação da cognição dos pacientes (OLÁH et al., 2012).

Para um diagnóstico mais efetivo, estão sendo desenvolvidas técnicas para detecção de biomarcadores e técnicas de imagem, que ainda não estão amplamente disponíveis. A DA pode ser detectada usando biomarcadores que representem as condições da função e da estrutura neuronal, tais como o metabolismo de glicose medido por tomografia de emissão de pósitrons com 18f-fluorodeoxiglicose, e a medida da espessura cortical e do volume do hipocampo, ambos delineados a partir de imagens de ressonância magnética estrutural (WIRTH et al., 2013). Além disso, a diminuição da β -amilóide 1-42 e aumento da tau e da fosfo-tau podem ser detectadas no fluido cerebrospinal (CSF) de pacientes com DA, sendo essas moléculas consideradas os principais biomarcadores da patologia (OLÁH et al., 2012).

Os marcadores clássicos que caracterizam a doença são a formação de placas amilóides extracelulares, a partir do processamento amiloidogênico da APP, e de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, a partir da hiperfosforilação da proteína tau (JIANG et al., 2014). Evidências genéticas, neurobiológicas, moleculares e estudos comportamentais sugerem que a produção aumentada e/ ou

a eliminação diminuída das formas aberrantes de β -amilóide é o problema inicial para os defeitos sinápticos e problemas cognitivos da DA (O`NEILL, 2013).

A proteína precursora de amilóide (APP) é uma proteína transmembrana integral, que está envolvida na transdução de sinais, alongamento axonal, adesão e migração celular, transporte de proteínas e sinaptogênese (JIANG et al., 2014). Ainda, o seu domínio C-terminal possui papel importante na expressão gênica e sobrevivência neuronal (MOKHTAR et al., 2013). A clivagem normal ou não amiloidogênica da APP é realizada pela α -secretase, enquanto a clivagem através das enzimas β - e γ -secretase é amiloidogênica, formando a proteína β -amilóide (GRIMM et al., 2013; ROBINSON et al., 2013; JIANG et al., 2014). O peptídeo β -amilóide é normalmente produzido como um metabolito solúvel da APP, mas, no curso da doença, forma agregados e acumula no cérebro na forma de placas difusas e compactas (LORENZO, YANKNER, 1994). A γ -secretase determina o comprimento do peptídeo β -amilóide, sendo a β -amilóide 1-40 mais comum, e a β -amilóide 1-42 com maior capacidade de formar emaranhados e mais neurotóxica (GÖTZ, ITTNER, 2008), sendo proposta como sua região biologicamente ativa a β -amilóide 25-35 (CHEN et al., 2010). O componente catalítico do complexo enzimático γ -secretase é formado pelas proteínas Presinilinas 1 (PS1) e 2 (PS2) (ROBINSON et al., 2013).

As lesões neurofibrilares da DA também contêm agregados da proteína tau, uma fosfoproteína que se torna alvo para diferentes quinases. Em condições fisiológicas normais, a tau está localizada nos axônios e atua na estabilização dos microtúbulos. Entretanto, em condições patológicas, como na DA, a tau está hiperfosforilada. Esta hiperfosforilação causa a sua dissociação dos microtúbulos, e, conseqüentemente, a despolimerilação dos mesmos (GÖTZ, ITTNER, 2008). A

hiperfosforilação anormal da tau origina inclusões de corpos celulares e processos dendríticos, aos quais a proteína se agrega e acumula na forma de filamentos helicoidais pareados, formando os emaranhados neurofibrilares. Esse processo contribui para a despolimerização dos microtúbulos, rompimento do citoesqueleto axonal e morte neuronal (MOKHTAR et al., 2013).

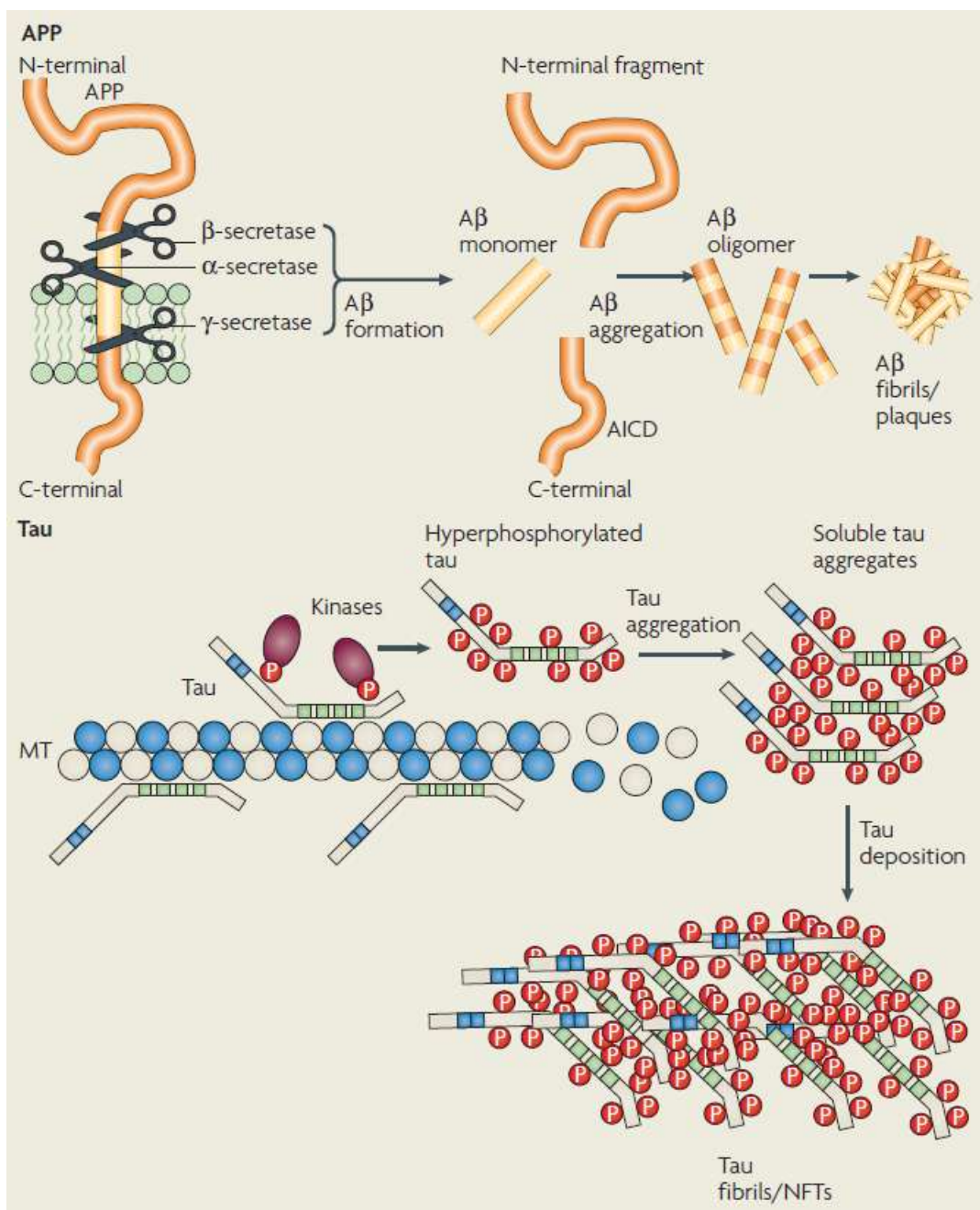


Figura 1: Formação do peptídeo β -amilóide e hiperfosforilação da tau (GÖTZ, ITTNER, 2008).

Os estudos atuais indicam que as anormalidades da DA dependem das interações da proteína tau e do peptídeo β -amilóide (MOKHTAR et al., 2013). As sinapses parecem ser o principal alvo dos oligômeros tóxicos de β -amilóide (CANAS et al., 2009), sendo que o curso da doença leva a uma perda de neurotrofinas, neurotransmissores, disfunção mitocondrial com estresse oxidativo e aumento do cálcio citosólico, além de falhas no ciclo celular normal (QUERFUTH, LAFERLA, 2010).

As alterações fisiopatológicas mais graves acontecem no hipocampo, seguidas pelas alterações nas regiões corticais e subcorticais, incluindo amígdala e núcleo basal de Meynert (GÖTZ, ITTNER, 2008). Uma das regiões cerebrais em que a geração de novos neurônios é contínua ao longo de toda a vida é zona subgranular do giro denteado do hipocampo. Os neurônios dessa região podem ser ativados por diferentes estímulos, a exemplo de experiências comportamentais e estimulação elétrica. Estudos também demonstram que a neurogênese na idade adulta é necessária para formação de memória espacial dependente do hipocampo (HAGG, 2005; BELARBI, ROSI, 2013). Com o envelhecimento, a proliferação e diferenciação de células progenitoras de neurônios diminui significativamente, o que ocorre inicialmente no giro denteado. Esse processo pode estar relacionado com o gradual avanço de alterações cognitivas associado ao avanço de idade (BARON et al., 2008).

Os principais sinais e sintomas presentes na DA são a perda de memória recente, que se manifesta através de perguntas repetitivas, perda de objetos pessoais e esquecimento de coisas cotidianas, assim como do caminho para locais frequentados. Em estágios avançados da doença, os indivíduos apresentam dependência crescente e progressão para um estado de incapacidade de se mover

ou falar. Ocorre também a atrofia do lobo temporal medial (HAJ, KESSELS, 2013). Esses sintomas estão associados à disfunção das estruturas responsáveis pela formação da memória, já que a patologia atinge as regiões corticais e o hipocampo (WIRTH et al., 2013). São as conexões realizadas pelo sistema límbico, responsável pelas emoções e comportamentos sociais, que medeiam o início da codificação da memória, ao passo que o circuito córtico-hipocampal provavelmente forma os vestígios de memória. Dentro dos hipocampos de roedores, as projeções para o giro denteado transportam os estímulos corticais mais importantes, sendo responsáveis pela separação das informações, pela informação espacial e a codificação de memória. O hipocampo codifica e consolida esses traços de memória por meio de oscilações, criadas por potenciais de ação sintonizados de ambas células excitatórias e inibitórias (HAZRA et al., 2013).

A disfunção sináptica é detectada em estágios iniciais da DA, quando os déficits na formação de memória pelo hipocampo já podem ser percebidos clinicamente (SCLIP et al., 2014). Na DA moderada há redução de cerca de 25% na proteína de vesícula pré-sináptica sinaptofisina. A transmissão basal de impulsos únicos e a potenciação de longa duração (LTP), um indicador experimental de formação de memória, estão reduzidas em modelos experimentais da DA, levando à inibição de moléculas de sinalização importantes para a formação de memória (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

Na DA, a expressão do fator neurotrófico do nervo (NGF) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) também está alterada, já em fases iniciais da doença. O NGF tem importância na promoção e manutenção de contatos das sinapses colinérgicas com neurônios do hipocampo e do córtex (ALLEN et al., 2011). Na ausência de NGF, os neurônios colinérgicos apresentam encolhimento celular,

redução na densidade da fibra e declínio da transmissão colinérgica (SCHINDOWSKI et al., 2008). No hipocampo, o BDNF é um componente vital para plasticidade sináptica e formação de memória. Problemas na expressão dessas neurotrofinas estão associados ao comprometimento da formação de memória e à neurodegeneração presentes no Alzheimer (ALLEN et al., 2011).

Além disso, estudos revelam a atrofia de vários sistemas de neurotransmissores durante o curso da DA, demonstrando deficiências serotoninérgicas, noradrenérgicas, histaminérgicas e GABAérgicas. Entretanto, são as alterações nos sistemas colinérgico e glutamatérgico, em especial no primeiro, que são mais intensas e, provavelmente, desencadeiam as demais alterações (TRAN et al., 2012). A acetilcolina (ACh) possui importante papel no aprendizado, atenção e plasticidade sináptica. A β -amilóide é capaz de induzir disfunções em receptores colinérgicos, prejudicando a liberação de ACh e a manutenção da LTP. Desta forma, a β -amilóide diminui a neurotransmissão colinérgica, contribuindo assim para as alterações cognitivas envolvidas na DA (CHEN et al., 2010; QUERFURTH; LAFERLA, 2010; RUIVO, MELLOR et al., 2013).

Apesar do principal sintoma da DA ser a dificuldade de aprendizado e a grave perda de memória, outros sintomas incluem desorientação, alterações de comportamento e humor, confusão mental, temporal e dificuldades de localização. Com o avanço da doença e de sua gravidade, os pacientes passam a não reconhecer as pessoas e apresentar dificuldades de fala, deglutição e locomoção (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

1.2 Tratamento da Doença de Alzheimer

Os fármacos aprovados para o tratamento da DA são os colinérgicos tacrina, donepezila, rivastigmina e galantamina; e o antagonista do receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), memantina, sendo que a tacrina é pouco utilizada devido à intensidade dos efeitos adversos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

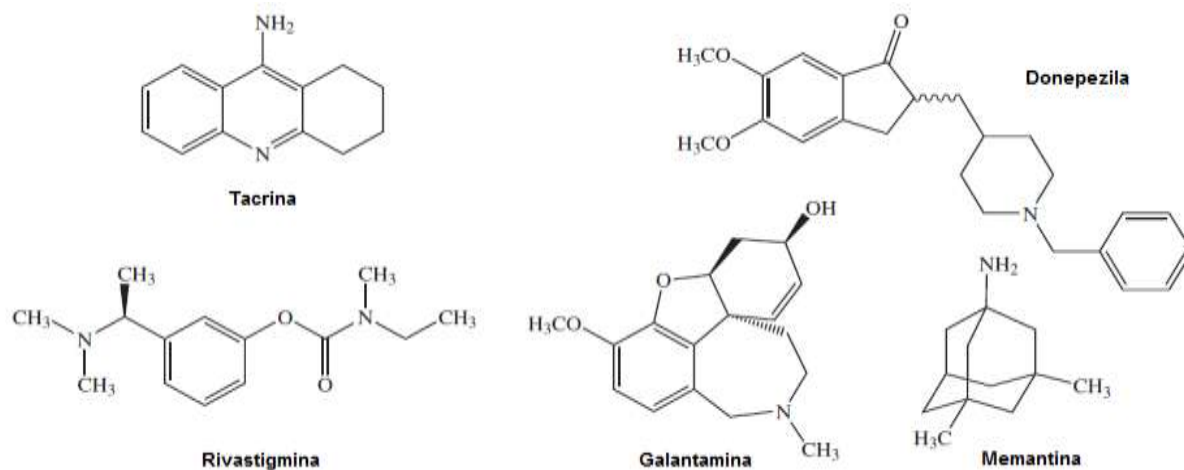


Figura 2: Fármacos Utilizados no tratamento da DA (DANUELLO et al., 2012).

A base do tratamento da DA é principalmente a ampliação da transmissão colinérgica, através da utilização dos inibidores reversíveis das colinesterases. As colinesterases são as enzimas responsáveis pelo metabolismo da Ach, em colina e ácido acético, na fenda sináptica, e compreendem a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). Esses fármacos atuam na melhora dos sintomas relacionados à memória e cognição (COLOVIC et al., 2013).

A tacrina foi a primeira droga aprovada para o tratamento da DA, em 1993, tendo sido capaz de melhorar os testes de memória e cognição de pacientes com a doença em 40%. No entanto, provoca efeitos colinérgicos intensos, tais como náusea e cólicas abdominais, além de hepatotoxicidade, sendo raramente utilizada. A donepezila (1996), a rivastigmina (2000) e a galantamina (2001) também

apresentam eficácia limitada, mas são mais efetivos para a melhora da qualidade de vida dos pacientes (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

Tabela 1: Inibidores da Colinesterase Utilizados no tratamento da DA (Adaptado de SUN et al., 2012)

Inibidores da Colinesterase usados no Tratamento da DA				
	TACRINA	DONEPEZIL	RIVASTIGMINA	GALANTAMINA
Nome comercial	COGNEX®	ARICEPT®, ERANZ®	EXELON®, genérico	RAZADYNE®, REMINYL®, genérico
Enzima inibida	AChE, BuChE	AChE	AChE, BuChE	AChE
Dose recomendada	160 mg/ dia 4 vezes/ dia	10 mg/ dia única	9,5 mg/ dia (transdérmica) 12 mg/ dia 2 vezes/ dia (oral)	24 mg/ dia 2 vezes/ dia
Fase da DA	---	Todos os estágios	DA leve a moderada	DA branda a moderada
Reações adversas	Hepatotoxicidade	Diarreia, náusea	Diarreia, náusea	Náusea, perda de peso

A memantina é um antagonista não competitivo do receptor de glutamato NMDA, sendo utilizada como tratamento coadjuvante ou alternativo aos inibidores das colinesterases na DA moderada a grave (ROBERSON, MUCKE, 2006; ARIF et al., 2009). Ela atua diminuindo a alta excitabilidade glutamatérgica em pacientes com DA, prevenindo a morte de neurônios por alto influxo de cálcio (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

Os inibidores das colinesterases e a memantina, entretanto, influenciam pouco a memória, a cognição e os comportamentos diários em estágios avançados da doença (TELL, HILGEROTH, 2013). Além das drogas supracitadas, podem ser utilizados antidepressivos e/ ou antipsicóticos no tratamento de sintomas psiquiátricos que, em geral, aparecem na fase intermediária da doença (ROBERSON, MUCKE, 2006).

Apesar do tratamento atual para DA ser apenas sintomático, são realizadas pesquisas baseadas na neurobiologia da doença, o que tem levado ao desenvolvimento de vacinas, drogas anti-inflamatórias e moduladores da formação, agregação e depuração de β -amilóide e tau (GÖTZ, ITTNER, 2008). Além disso, uma alternativa de tratamento poderia se basear na modulação de moléculas reguladoras que normalmente controlam o destino das células-tronco neurais e sua diferenciação em células do Sistema Nervoso Central (SNC) (HAGG, 2005).

1.3 Modelos animais de Doença de Alzheimer

Modelos animais são de grande importância para elucidar os mecanismos patogênicos da DA. Os modelos animais já permitiram vários avanços no estudo da DA, como a verificação de que a redução da proteína tau diminui a toxicidade mediada por β -amilóide, a pesquisa de espécies tóxicas e a elucidação do papel das secretases (GÖTZ, ITTNER, 2008).

1.3.1 Modelos espontâneos

Os modelos animais com predisposição a senescência acelerada (SAMP, *Senescence-accelerated mouse prone*) foram desenvolvidos para ter um tempo de vida útil mais curto ou rápido avanço da senescência. Os animais das linhagens

SAMP 8 e SAMP 10 apresentam problemas de aprendizado e memória associados com a idade. SAMP 8, em particular, é um modelo de DA, em que os animais desenvolvem degeneração cerebral espontânea e expressão excessiva de APP e β -amilóide no cérebro (ITO, 2013).

1.3.2 Modelos genéticos

A expressão de mutações para a DA em animais transgênicos provoca a formação de placas e neurodegeneração. Dentre os modelos genéticos que podem atuar modulando β -amilóide, estão os camundongos expressando a APP, a tau e/ ou a PS-1 mutante.

Os modelos de camundongos expressando a APP mutante, que reproduzem a formação de placas amiloides e a perda de memória, são a ferramenta mais utilizada para estudo dos mecanismos patogênicos associados à AD, como a linhagem Tg2576.

A linhagem transgênica de camundongos que expressa a tauP_{301L} reproduz a agregação e a formação de emaranhados neurofibrilares em camundongos. A linhagem que expressa a tauP_{301S} possui maior perda neuronal em diversas áreas cerebrais, além de aumento dos ventrículos. A linhagem JNPL3 transgênica para tauP_{301L} pode ser cruzada com os camundongos transgênicos para APP Tg2576; ou a linhagem pR5, outro transgênico para tauP_{301L}, pode ser associada à injeção intracerebral de β -amilóide 1-42 ($A\beta_{1-42}$), para aumentar a fosforilação da tau e a formação dos aglomerados neurofibrilares (GÖTZ, ITTNER, 2008).

Além disso, há modelos genéticos que interferem na β - e γ -secretase. A alteração da atividade da γ -secretase, através da expressão de PSEN-1_{M146L} em camundongos transgênicos para APP, aumenta a formação e deposição de β -

amilóide, e permite a observação de perda neuronal e déficits cognitivos. Os camundongos triplo transgênicos 3xTg-AD desenvolvem um acúmulo, de acordo com a idade, de placas e emaranhados neurofibrilares. São originados pela microinjeção de dois transgenes independentes que codificam APP_{Swe} humana e tauP_{301L} humana em uma única célula de embriões de camundongos homozigotos mutantes para PS-1_{M146V} (ODDO et al., 2006). Esse modelo representa com bastante proximidade a DA humana.

Há também os modelos que modulam o alelo ApoE4, fator de risco para desenvolvimento da DA. A associação de ApoE4 a camundongos transgênicos para APP aumenta a formação de depósitos de β -amilóide (GÖTZ, ITTNER, 2008).

1.3.3 Modelos por indução de dano

A injeção intracerebral de estreptozotocina é considerada modelo esporádico de DA, através da indução de dano cerebral (ZAMANI et al., 2012). A estreptozotocina induz perda de memória e leva a dificuldade de aprendizado, induz deficiência colinérgica no cérebro, estresse oxidativo, bem como diminuição no metabolismo energético (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2013).

Diversos estudos demonstram também que a injeção intracerebral de β -amilóide é capaz de induzir problemas de memória e outras alterações neurológicas presentes na DA, sendo um modelo amplamente utilizado. Podem ser utilizados os peptídeos β -amilóide 1-40, 1-42 e 25-35. Entre os sítios de injeção mais utilizados estão os ventrículos e os hipocampus (GIOVANNINI et al., 2002; PREDIGER et al., 2007; CANAS et al., 2009; CHEN et al., 2010; PASSOS et al., 2010; XUAN et al., 2012). O modelo escolhido para indução do modelo murino de DA no presente

estudo foi de injeção intra-hipocampal unilateral de A β ₁₋₄₂, uma vez que é capaz de induzir os déficits cognitivos e outros sintomas associados à doença.

1.4 Inflamação na Doença de Alzheimer

Inflamação é uma reação ativa de defesa contra diversos insultos, que tem o objetivo de remover ou inativar agentes nocivos, além de inibir ou reverter seus efeitos prejudiciais. Vários componentes constituem o processo inflamatório, que pode ser desencadeado por micro-organismos invasores, substâncias químicas, e insultos físicos. Pode ainda se originar de processos intrínsecos de um organismo, como doenças do sistema imune ou doenças neurodegenerativas (WYSS-CORRAY, MUCKE, 2002).

Nas doenças neurodegenerativas, a inflamação pode começar pelo acúmulo de agregados ou proteínas modificadas, sinalização de neurônios afetados ou desequilíbrio entre processos pró- e anti-inflamatórios (WYSS-CORRAY, MUCKE, 2002). Além disso, tem sido proposto que o próprio processo inflamatório, crônico, pode resultar em modificações na estrutura cerebral e na plasticidade sináptica, levando à neurodegeneração (HURLEY, TIZABI, 2013).

A resposta inflamatória no SNC é mediada inicialmente pelas células da glia, em especial a micróglia (HURLEY, TIZABI, 2013). A ativação microglial ocorre em condições como infecções, traumas, doenças neurodegenerativas ou atividade neuronal alterada, que provocam a mudança na forma e atividade dessas células. A micróglia migra para as regiões lesadas e pode proliferar, liberar fatores e compostos pró-inflamatórios e imunorreguladores, exercer atividade fagocítica, liberar quimiocinas ou ainda atuar na produção de fatores neurotróficos. Essas células ainda expressam mRNAs e proteínas constitutivas ou induzíveis como fator de

necrose tumoral (TNF) $-\alpha$, interleucina (IL) -6 , fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) -1 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (KETTENMAN et al., 2011).

A ativação da micróglia pode, através da sua ativação clássica, liberar fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, a exemplo de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 e proteína quimioatraente para monócitos. A ativação clássica pode ser induzida experimentalmente por exposição a citocinas pró-inflamatórias, como o interferon (IFN) $-\gamma$ ou o próprio TNF- α e a IL-1 β . A ativação dessas células da glia pode também ocorrer por uma via alternativa, caracterizada como protetora, por liberar as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4, o fator de transformação do crescimento (TGF) $-\beta$, e fatores de crescimento, como IGF-1, NGF e BDNF. A ativação alternativa da micróglia pode ser induzida por IL-4 e IL-13, citocinas anti-inflamatórias. Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 podem inibir especificamente a produção de precursores neurais, diferenciação e sobrevivência neuronal. Por outro lado, as citocinas IL-4 e IL-10, TGF- β e IGF-1 estimulam a neurogênese (BELARBI, ROSI, 2013).

O próprio envelhecimento é caracterizado por um processo inflamatório crônico leve e aumento da ativação microglial (BELARBI, ROSI, 2013). Entretanto, na DA, a inflamação é considerada um evento secundário à deposição de β -amilóide no cérebro, se iniciando como defesa aos efeitos prejudiciais provocados pela formação dos emaranhados neurofibrilares, e posteriormente contribuindo para um processo de degeneração neuronal (GIOVANNINI et al., 2002). Está bem estabelecido ainda que, através de um processo quimiotático que leva à sua migração, células microgliais acumulam nas placas formadas na DA. Quimiocinas podem estar envolvidas nesse recrutamento, uma vez que anticorpos que neutralizam as mesmas atenuam a migração das células gliais para as placas de β -

amilóide (HICKMAN et al., 2008; KETTENMAN et al., 2011). A micróglia expressa receptores que promovem a remoção e fagocitose das placas amiloides, bem como a própria micróglia restringe a formação das placas, fagocitando a β -amilóide e produzindo enzimas que atuam na sua degradação (HICKMAN et al., 2008).

A ativação da micróglia pode, por outro lado, contribuir para o processo neurodegenerativo através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, neurotoxinas e outros produtos (GIOVANNINI et al., 2002), como espécies reativas de oxigênio, que culminam com a morte neuronal (MOKHTAR et al., 2013). A micróglia associada às placas amiloides apresenta altos níveis de ativação de fosfoproteínas tirosinas, indicando a ativação sustentada de vias de sinalização intracelulares e levando à produção de produtos neurotóxicos, uma das possíveis causas de morte neuronal (GIOVANNINI et al., 2002).

Segundo Hickman e colaboradores (2008), a neuroinflamação promovida pela micróglia é importante para a progressão da DA, tendo em vista que essas células reduzem, com o envelhecimento, a expressão de receptores que se ligam à β -amilóide, bem como a produção das enzimas que degradam o peptídeo, mas não perdem a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , que, por sua vez, estimulam a formação da β -amilóide.

Apesar de todas essas evidências de que processos neuroinflamatórios, que envolvem a microglia, estão envolvidos com a fisiopatologia da DA, as terapias com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) convencionais produziram resultados conflitantes e inconclusivos, e não há um consenso se previnem a doença ou podem auxiliar em seu tratamento (XUAN et al., 2012).

Outros mecanismos que contribuem para o dano neuronal incluem a vulnerabilidade dos neurônios, a indução das atividades de apoptossomos e

protease lisossomal, mudanças no influxo de cálcio e peroxidação das membranas (MOKHTAR et al., 2013). Os próprios neurônios podem, inclusive, produzir moléculas inflamatórias, como prostanóides derivados de ciclo-oxigenase (COX) -2, citocinas e fator estimulador de colônias de macrófagos (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008).

Os mediadores inflamatórios e a condição de estresse causada pelo processo inflamatório crônico, por sua vez, aumentam a produção da APP e o seu processamento amiloidogênico para formar mais β -amilóide. Essas circunstâncias inibem a formação da APP solúvel, que possui efeito neuroprotetor. As placas amiloides formadas induzem, então, aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias via células da glia em um ciclo vicioso, contribuindo para aumento da morte neuronal (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2012).

1.5 Papel da via PI3K/ Akt/ mTOR na Doença de Alzheimer

O controle normal de ativação ou inibição da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (Akt) / alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), em especial a ativação por IGF-1, integra uma das respostas fisiológicas fundamentais para um envelhecimento saudável e longevidade (O'NEILL, 2013), uma vez que regula metabolismo, crescimento e sobrevivência celular (KITAGISHI et al., 2012). O controle anormal dessa via está envolvido na causa de várias doenças associadas ao envelhecimento, como câncer, diabetes mellitus tipo 2, distúrbios cardíacos e neurodegeneração (O'NEILL, 2013).

A PI3K é uma lipase de lipídeo celular, que converte fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) (PASSOS et al., 2010), e gera vários segundos mensageiros que proporcionam um mecanismo comum para

várias etapas durante a transdução de sinal intracelular. A Akt é o principal alvo da PI3K para regular o crescimento e a migração celular. A ativação da Akt ocorre pela fosforilação de seu domínio regulatório carboxi-terminal, a mesma migra para o citoplasma e fosforila, ativa ou inibe outros alvos para regular a função celular (Figura 4). Uma vez ativada, a Akt fosforila diferentes substratos envolvidos na regulação de sobrevivência, crescimento, proliferação e metabolismo celular (HUANG, MANNING, 2009; KITAGISHI et al., 2012).

Uma das vias reguladas pela Akt envolve a mTOR. A Akt inibe a proteína ativadora de GTPase (GAP) dos complexos da esclerose tuberosa (TSC) 1 e 2 através da fosforilação da tuberina de TSC2, levando ao acúmulo e ativação do complexo de mTOR. Através de mecanismos de feedback negativo, a atividade desse complexo inibe a estimulação de fatores de crescimento por PI3K. A Akt também diminui a ativação de GSK3, que está envolvida na proliferação celular, programação de morte celular, embriogênese, controle circadiano, além da regulação da glicogênese. A regulação da atividade da via PI3K/ Akt é realizada pela fosfatase PTEN, que converte PIP3 em PIP2 (Figura 4; HUANG, MANNING, 2009; KITAGISHI et al., 2012).

A ativação adequada da via PI3K/ Akt e a sua contrarregulação é importante na manutenção da polaridade axônio-dendrito e na transição entre LTP e depressão de longa duração (LTD), fundamentais na regulação na função sináptica e no processamento cognitivo. A síntese proteica estimulada por mTOR é fundamental para a manutenção da eficácia sináptica, incluindo LTP e LTD. A hiperativação de mTOR, entretanto, é um mecanismo responsável pela tradução anormal e aumentada de proteínas nas sinapses, estando implicada na DA. A desregulação desse sistema pode ter graves efeitos sobre aprendizagem e memória. Já foi

demonstrado que os níveis aumentados da tau presentes na DA, associado à atuação da β -amilóide, prejudicam aspectos da transmissão glutamatérgica normal e de LTP e LTD, levando a um estágio de hiper-estimulação excitatória (COSTA-MATTIOLI, MONTEGGIA, 2013; O'NEILL, 2013).

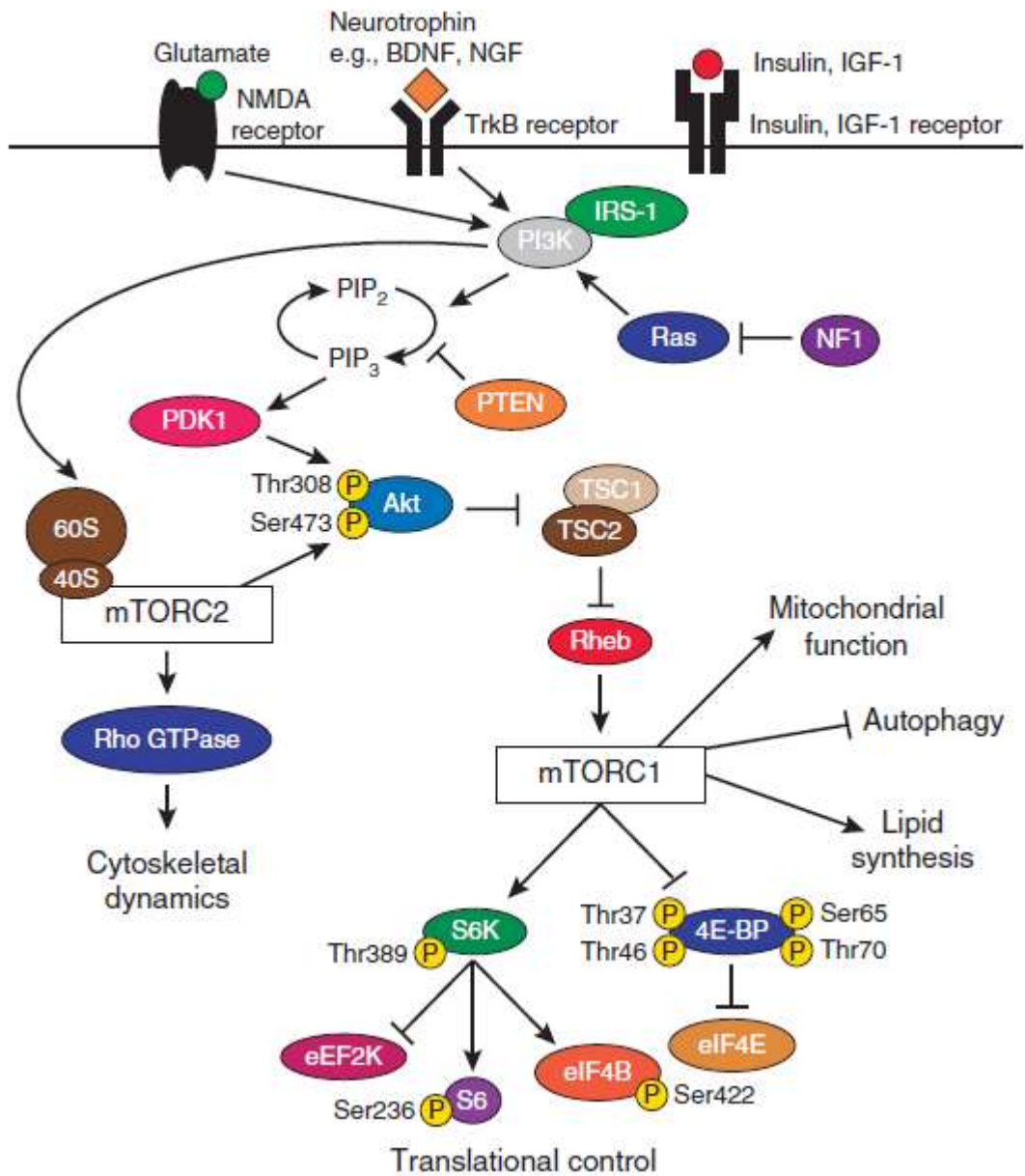


Figura 3: Representação esquemática da sinalização da via PI3K/ Akt/ mTOR (COSTA-MATIOLI et al., 2013).

Vários estudos demonstram que em fases iniciais da DA, há uma ativação anormal e continuada da sinalização PI3K/ Akt/ mTOR, associada à dessensibilização e remoção da resposta cerebral normal à insulina/ IGF-1, o que contribui para o desenvolvimento da doença e declínio cognitivo (O'NEILL, 2013). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* em camundongos deficientes para PI3K γ , uma isoforma da PI3K, indicam prejuízo na migração de neutrófilos e macrófagos mediadas por quimioatraentes, bem como o bloqueio farmacológico dessa enzima resulta em redução da migração celular para os sítios inflamatórios em modelos murinos e doenças inflamatórias crônicas (PASSOS et al., 2010).

Conforme relatado por Bhaskar e colaboradores (2009), já foi demonstrado que oligômeros de β -amilóide modulam a expressão e densidade de receptores de insulina, os quais medeiam o crescimento e sobrevivência celular através da via PI3K/ Akt. Somando-se a isso, há aumento dos níveis de mTOR fosforilado e diminuição de inibidores do ciclo celular no córtex de pacientes com DA, além de alterações na sinalização de mTOR pós exposição à β -amilóide em pacientes e em modelo murino de DA. A ativação de mTOR também aumenta a neurodegeneração induzida por mTOR em modelo de taupatia em *Drosophila*.

Passos e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição da PI3K γ por AS605240, em modelo murino de DA induzido por β -amilóide 1-40, é capaz de atenuar o acúmulo de astrócitos e micróglia no hipocampo, bem como de prevenir os déficits cognitivos e a disfunção sináptica presentes na doença.

Inibidores da via PI3K estão sendo ativamente desenvolvidos para tratamento de diferentes tipos de câncer, uma vez que a via está frequentemente ativada nessa doença. Os inibidores duais de PI3K e mTOR são particularmente efetivos na inibição da Akt, uma vez que a inibição apenas de mTOR pode resultar na ativação

aumentada do eixo PI3K por um mecanismo de *feedback*. A inibição dupla com inibidores duais, como o NVP-BEZ235, pode ser suficiente, portanto, para prevenir a ativação retrógrada da via (MAIRA et al., 2008; MUKHERJEE et al., 2012).

O NVP-BEZ235 é um inibidor dual de PI3K e mTOR, que possui potente atividade antitumoral *in vivo* (MAIRA et al., 2008). A droga inibe as quinases através de ligação ao sítio de ligação de ATP dessas moléculas.

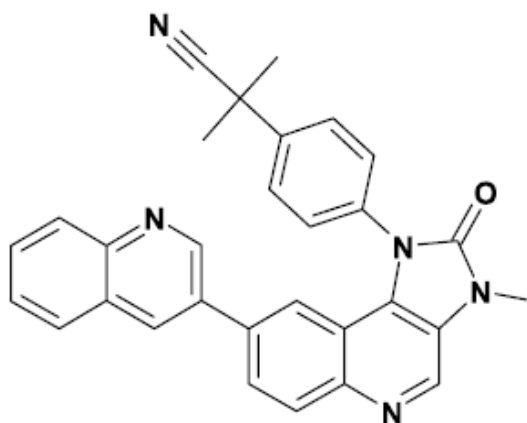


Figura 4: Estrutura química do NVP-BEZ235 (MAIRA et al., 2008).

Em culturas microgliciais estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), foi demonstrado por de Oliveira e colaboradores (2012) que NVP-BEZ235 aumenta a expressão de COX-2, mas diminui a prostaglandina E sintase microssomal (mPGES)-1. O inibidor dual de PI3K e mTOR é, no entanto, capaz de aumentar prostaglandina (PG) E2 e mPGES-1 em células não estimuladas, sugerindo que ele pode regular a expressão de mediadores inflamatórios de diferentes formas, de acordo com as condições externas.

Considerando a participação da via PI3K/ Akt/ mTOR em neuroinflamação e neurodegeneração, o estudo dos seus mecanismos envolvidos na DA torna-se relevante para fornecer informações sobre a fisiopatologia da doença e avaliar possíveis alvos terapêuticos para o tratamento dessa condição patológica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito de um inibidor dual de PI3K/ mTOR em alterações induzidas por $A\beta_{1-42}$ *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Induzir modelo de DA em camundongos C57Bl/6 através de injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$;
- Testar a hipótese de que os tratamentos com NVP-BEZ235 e rivastigmina melhoram o déficit cognitivo induzido pela injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$ em camundongos C57Bl/6;
- Testar a hipótese de que o tratamento com NVP-BEZ235 altera a produção de citocinas no hipocampo induzidas pela injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$ em camundongos C57Bl/6;
- Testar a hipótese de que os tratamentos com NVP-BEZ235 e rivastigmina alteram a produção de fatores neurotróficos no hipocampo induzidas pela injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$ em camundongos C57Bl/6;
- Testar a hipótese de que o tratamento com NVP-BEZ235 altera a morte de neurônios hipocampais induzida pela injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$ em camundongos C57Bl/6;
- Testar a hipótese de que o tratamento com NVP-BEZ235 altera a viabilidade de neurônios hipocampais diminuída pela injeção intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$ em camundongos C57Bl/6;

- Testar a hipótese de que os tratamentos com NVP-BEZ235 e memantina alteram a morte neuronal em culturas de neurônios hipocámpais induzida pela adição de $A\beta_1$.

42.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pesando em torno de 25 gramas e com idade entre 10 e 12 semanas. Os animais tiveram livre acesso a água e comida, sendo mantidos em ciclo claro/escuro a cada 12 horas com temperatura local de 24 °C. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo este projeto aprovado pelo protocolo CEUA n° 336/2012.

3.2 Drogas

Para a realização do presente estudo, foram usadas as seguintes drogas: β -amilóide [1-42] (Human) (invitrogen), NVP-BEZ235, Free Base (Cayman Chemical Company), rivastigmina, memantina (Ranbaxy), Cloridrato de Cetamina 10% (Syntec) e Cloridrato de Xilazina 2% (Syntec).

3.3 Cirurgia estereotáxica e microinjeção intrahipocampal de β -amilóide 1-42

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), sendo, em seguida, submetidos à tricotomia do escalpo e seu crânio fixado a um aparelho estereotáxico (Insight®). Posteriormente, foi realizada a assepsia do escalpo com álcool iodado e uma incisão sagital para exposição e limpeza da calota craniana. Para microinjeção, uma agulha odontológica gengival 30 G (8 mm) foi introduzida no hipocampo dorsal direito e as

coordenadas estabelecidas de acordo com o Atlas Paxinos & Watson (2001): -1,5 mm lateral, -2,3 mm dorso-ventral e -1,9 mm ântero-posterior em relação ao bregma. A agulha foi conectada a um segmento de polietileno (P10) e este a uma seringa Hamilton® de 10 µl. As injeções foram realizadas por uma bomba de infusão (Insight®) sendo o volume por sítio injetado 0,5 µl, a uma taxa de infusão de 1 µl/min. Após a injeção, a agulha permaneceu no interior do encéfalo do animal por 2 minutos, para evitar refluxo da droga. Após cada injeção, a bomba de infusão foi novamente acionada, com a finalidade de se verificar se a agulha não estava entupida. Ao término da cirurgia, os animais permaneceram no laboratório até completa recuperação. Após esse período, foram levados ao biotério, onde permaneceram até o término do tratamento e dos procedimentos experimentais.

3.4 Protocolo experimental

Os animais receberam tratamento com NVP-BEZ235 25 mg/Kg diluído em 1-metil 2-pirrolidona (NMP) P.A. (Synth) e polietilenoglicol (PEG) 300 U.S.P. (Synth) na proporção de 1 parte para 9, por via oral (v.o.), através de gavagem intra-gástrica (SERRA et al., 2008; CAO et al., 2009b; YANG et al., 2013; SUNEAGA et al., 2014). Em outro protocolo experimental, os animais receberam rivastigmina 0,3 mg/Kg diluída em cloreto de sódio 0,9% (NaCl 0,9%) (Química Moderna), por via i.p, conforme descrito na literatura (Meunier et al., 2006). O tratamento foi iniciado 1 hora antes da cirurgia estereotáxica e teve continuidade por mais 7 dias após a mesma, 1 vez por dia de 24 em 24 h. Os animais foram pesados todos os dias antes da administração do tratamento.

Para indução do modelo de DA, o peptídeo β -amilóide foi inicialmente diluído em água miliQ para obtenção de uma solução estoque de concentração 6 mg/mL.

Posteriormente, foram preparadas alíquotas contendo 400 pmol do peptídeo a cada 0,5 µL de solução, utilizando PBS estéril como veículo. As alíquotas foram incubadas a 37 °C por 48 h para agregação da β-amilóide. Foram injetados 0,5 µL do peptídeo ativado no hipocampo direito de cada animal.

Tabela 2: Protocolo Experimental.

Grupo	Administração intra-hipocampal	Tratamento	Legenda do grupo
I	PBS (0,5µL)	NaCl 0,9% i.p.	PBS + Veículo
II	Aβ ₁₋₄₂ (0,5µL 400pmol)	NaCl 0,9% i.p.	Aβ ₁₋₄₂ + Veículo
III	Aβ ₁₋₄₂ (0,5µL 400pmol)	Rivastigmina 0,3 mg/Kg i.p.	Aβ ₁₋₄₂ + Rivastigmina
IV	PBS (0,5µL)	NMP em PEG300 1:9 v.o.	PBS + Veículo
V	Aβ ₁₋₄₂ (0,5µL 400pmol)	NMP em PEG300 1:9 v.o.	Aβ ₁₋₄₂ + Veículo
IV	Aβ ₁₋₄₂ (0,5µL 400pmol)	NVP-BEZ235 25 mg/Kg v.o.	Aβ ₁₋₄₂ + NVP-BEZ235

3.5 Avaliação da memória através da Tarefa de Reconhecimento de Objetos

No 4º e no 5º dia após a cirurgia, os animais foram habituados em uma caixa de acrílico de dimensões 380 x 380 x 15 mm (comprimento x largura x altura), coberta por maravalha, durante 5 minutos. No 6º dia, foi realizado o pré-teste, em que os animais foram re-expostos à caixa, na qual foram introduzidos 2 objetos iguais, em diagonal, distando 80 mm das paredes da caixa, e foram mantidos na mesma por 10 minutos. No 7º dia foi realizado o teste, com a troca de um objeto antigo (OA) por um objeto novo (ON), e exposição por 5 minutos (adaptado de GALANY et al., 1988; MURAI et al., 2007). Ambos o pré-teste e o teste foram filmados e a composição da sala foi mantida a mesma nos 4 dias de experimento.

Os objetos foram limpos com álcool 70% entre os testes com cada animal, bem como as fezes de cada roedor foram retiradas da caixa antes do teste seguinte.

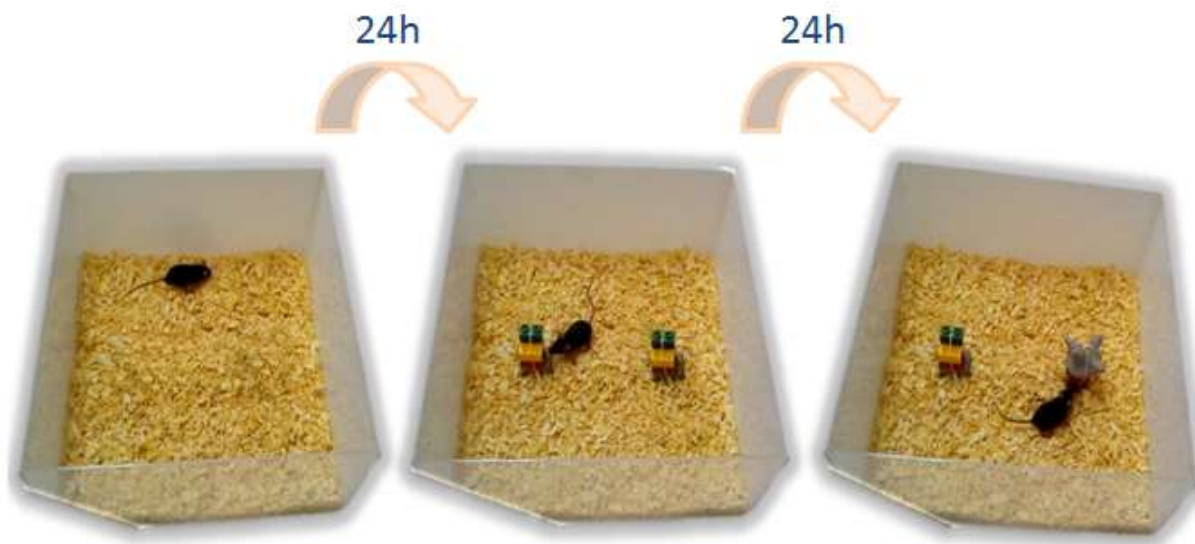


Figura 5: Figura ilustrativa das etapas da tarefa de reconhecimento de objetos.

Os vídeos foram analisados manualmente por meio do software ANY-maze versão 4.99, por experimentador cego aos grupos experimentais, e o índice de reconhecimento dos objetos foi calculado pela fórmula: tempo explorando ON/ (tempo explorando OA + tempo explorando ON). Foi calculada a distância percorrida pelos animais.

3.6 Medidas dos níveis de fatores neurotróficos e citocinas no hipocampo

Foram dissecados os hipocampus direito e esquerdo dos animais após o término da TRO. Os mesmos foram, então, devidamente acondicionados e estocados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, após o descongelamento, foram adicionadas às amostras $200\text{ }\mu\text{L}$ de solução inibidora de proteases [NaCl $0,4\text{ M}$; Tween 20 (Synth) $0,05\text{ }\%$; Bovine Serum Albumin (BSA) (Inlab) $0,5\%$; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (Calbiochem) $0,1\text{ mM}$; cloreto de benzetônio (Vetec) $0,1\text{ mM}$; EDTA 10 mM ;

20 UI de aprotinina (Sigma), diluídos em PBS], para extração de citocinas. As proteínas totais das amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) (Biorad Protein Assay) e, posteriormente analisadas pelo ensaio Ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (VersaMax ELISA Microplate Reader) para detecção da concentração dos fatores neurotróficos BDNF e NGF, e da citocina IL-1 β , utilizando kits DuoSet® da R&D Systems (R&D Systems), bem como pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o kit Th1/Th2 para detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-17A (BD). Os kits foram utilizados de acordo com os procedimentos descritos pelos fabricantes.

3.7 Perfusão intracardíaca e preparo dos cérebros para técnicas histológicas

Após o término da TRO, os animais foram anestesiados por via i.p. com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) e, em seguida, foram submetidos a uma toracotomia para exposição do coração. Uma agulha hipodérmica foi inserida no ventrículo esquerdo, por onde foram administradas as soluções de tampão fosfato em salina (PBS) e solução de paraformaldeído (PFA) (Dinâmica) tamponado 4% com o auxílio de uma bomba peristáltica (Insight®), a uma taxa de perfusão de 4 mL/min. Paralelamente, foi feita uma incisão no arco aórtico para permitir a saída do sangue. Após a completa a perfusão, os animais foram decapitados, os encéfalos retirados com o auxílio de uma espátula e estocados em solução de PFA tamponado 4 % por uma noite. Posteriormente, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose (Dinâmica) 30 % para desidratação das células, até completa saturação, e, em seguida, foram congelados em isopentano (Vetec) 99% e gelo seco (20 segundos) e estocados a -80 °C.

Os cérebros estocados foram cortados com o auxílio de um criostato (Leica) a -20 °C na espessura de 30 µm, e os cortes contendo a formação hipocampal foram colocados em uma solução crioprotetora [etilenoglicol (Synth) 24%; glicerol (Merck) 24 % NaH₂PO₄ (Dinâmica) 0,1256 %; Na₂HPO₄ (Química Moderna) 0,436 % diluídos em PBS] e estocados a -20 °C.

3.8 Marcação com violeta de cresila para avaliação de viabilidade celular

Os cortes de hipocampo estocados foram lavados em PBS 3 vezes por 30 minutos, e montados em lâmina gelatinizada. Após secas, as lâminas passaram por processo de deslipidização (EtOH 70%, EtOH 95%, EtOH 100% e Xilol I), hidratação (EtOH 100%, EtOH95%, EtOH70%, EtOH 50% e água destilada), foram marcadas com violeta de cresila 0,2 % (Vetec), lavadas e desidratadas (EtOH 50 %, EtOH 70 %, ácido acético 1%, EtOH 95 % e EtOH 100 %). As lâminas foram então mergulhadas em xilol e as lamínulas montadas com Entellan (Merck) (adaptado de QU et al., 2001).

As lâminas foram observadas ao microscópio de luz (Zeiss) nos aumentos de 10 e 40 vezes, sendo tiradas fotos das regiões Corno de Ammon (CA) 1, giro denteado e CA3 para quantificação da densidade de células marcadas. A quantificação foi realizada pela análise da densidade de células vivas através do software ImageJ.

3.9 Marcação com Fluoro-Jade® C para avaliação de morte neuronal

Os cortes de hipocampo estocados foram lavados em PBS 3 vezes por 30 minutos, e montados em lâmina gelatinizada. Após secas, as lâminas foram mergulhadas em solução básica de etanol (EtOH) 80 % em hidróxido de sódio

(NaOH) (Química Moderna) 1 % por 5 minutos, EtOH 70 % por 2 minutos e lavadas com água destilada por 2 minutos. Ao abrigo da luz, as lâminas foram incubadas em solução de permanganato de potássio (KMnO₄) (Synth) 0,06 % por 20 minutos, lavadas com água destilada por 2 minutos e incubadas em solução de Fluoro-Jade® C (FJC) (Merck Millipore) 0,0001 % em ácido acético (Vetec) 0,1 % por 20 minutos. Posteriormente, foram novamente lavadas com água destilada 2 vezes por 1 minutos e colocadas em estufa 37 °C. Após completa secagem, foram mergulhadas em xilol (Synth) por 1 minuto e as lamínulas montadas com DPX (Sigma) (adaptado de SCHUMUED et al., 2005)

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss) com filtro FITC no aumento de 10 vezes, sendo tiradas fotos das regiões CA1, giro denteado e CA3 para quantificação de células marcadas. A quantificação foi realizada pela análise do número de células vivas através do software ImageJ.

3.10 Cultura primária de neurônios hipocampais

Culturas de neurônios foram preparadas a partir da região do hipocampo do cérebro de camundongos C57Bl/6 recém-nascidos com até 2 dias de vida. Após a dissecação do tecido hipocampal, o mesmo foi submetido à digestão com tripsina, seguido por dissociação celular mecânica com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur polida no fogo. As células foram adicionadas ao meio Neurobasal suplementado com N2 e B27, 2,0 mM de GlutaMAX, 50,0 µg/ml de penicilina, e 50,0 µg/ml de estreptomicina e em seguida plaqueadas em placas de 4 poços previamente preparadas com poli-L-ornitina. As células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ em uma incubadora umidificada e cultivadas durante 10 a 12 dias *in vitro*, com troca de meio a cada 4 dias (adaptado de DORIA et al., 2013).

3.11 Ensaio de morte celular

Para o ensaio de morte celular, foi utilizado o kit Live/ Dead (Life Technologies). O kit é composto pelos reagentes calceína-AM-AM e homodímero de etídeo-1. O teste se baseia no princípio de que a calceína-AM-AM é permeável à membrana celular, porém, após ser clivada por esterases contidas em células vivas, a mesma se torna incapaz de atravessar a membrana, permanecendo retida dentro da célula e levando a um aumento da fluorescência verde ao longo do corpo celular. O homodímero de etídeo-1 só é capaz de permear células que apresentem membrana danificada, ou seja, em processo de morte. Após permear a membrana celular, o homodímero de etídeo-1 se liga aos ácidos nucleicos, emitindo fluorescência vermelha.

Os neurônios foram incubados por 20 h na presença de PBS ou $A\beta_{1-42}$ (10 pmol), e tratados com DMSO, memantina 30 μ M, NVP-BEZ235 20 μ M ou NVP-BEZ235 100 μ M. Após incubação, os neurônios foram marcados com calceína-AM-AM (2.0 μ M) e homodímero de etídeo-1 (2.0 μ M), preparado em solução de PBS 1X por 15 minutos na incubadora. Após este tempo, os neurônios foram lavados três vezes com PBS 1x.

As fotos foram obtidas por meio do microscópio FLoid[®], utilizando o filtro 488 nm para as imagens verdes (calceína-AM-AM) e 633 nm para as imagens vermelhas (homodímero de etídeo-1). Foi considerado um número mínimo de 300 células, vivas ou mortas, contidas 3 campos analisados por poço, utilizando o software ImageJ. O número de células mortas foi expresso como porcentagem do número total de células.

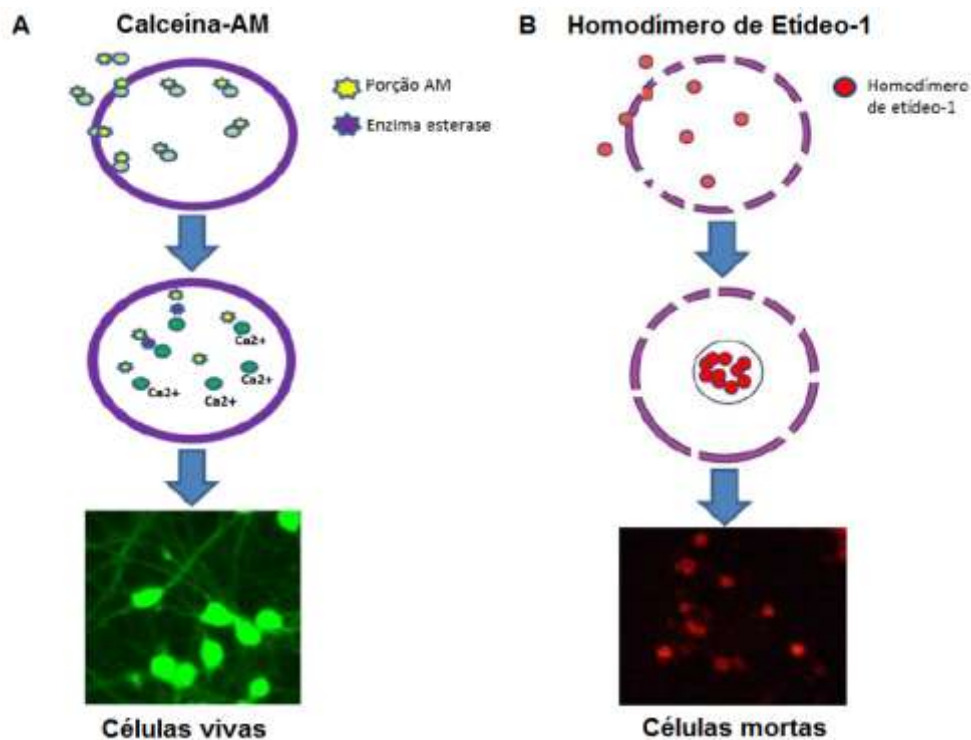


Figura 6: Princípio do ensaio de teste de viabilidade celular. Calceína-AM emitindo de fluorescência verde ao longo do corpo celular das células vivas (A) e homodímero de etídeo-1 emitindo fluorescência vermelha do núcleo das células mortas (B) (DÓRIA, 2013).

3.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Prisma 5.0 (GraphPad, CA, USA). Os dados comportamentais, bioquímicos, histológicos e da cultura de neurônios foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguidos pelo teste de Newman-Keuls para variáveis com distribuição paramétrica e pelo teste de Dunnet na curva dose vs resposta das concentrações de β -amilóide adicionadas à cultura. Os dados de massa corporal foram analisados por ANOVA de duas vias, seguidos pelo teste de Bonferroni. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Massa dos animais ao longo dos dias de tratamento

Todos os animais foram pesados antes do tratamento e da cirurgia estereotáxica e nos sete dias subsequentes à cirurgia. Os animais dos grupos PBS + Veículo (n=13), β -amilóide + Veículo (n=13) e β -amilóide + Rivastigmina (n=13) não tiveram alterações significativas de massa (g) ao longo dos 8 dias de tratamento (Figura 7), assim como os animais dos grupos PBS + Veículo (n=11), β -amilóide + Veículo (n=13) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=13) (Figura 8).

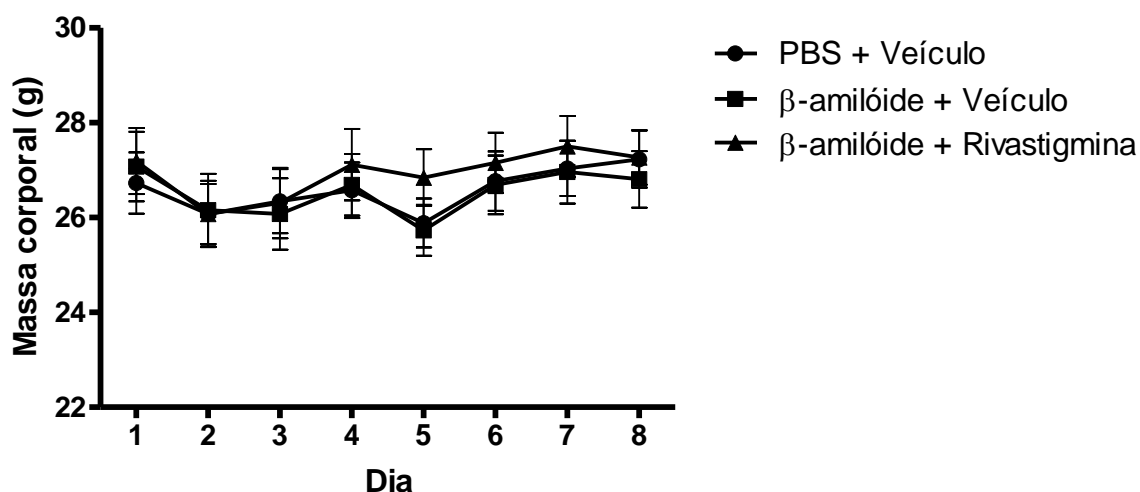


Figura 7: Massa corporal dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=13), β -amilóide + Veículo (n=13) e β -amilóide + Rivastigmina (n=13) ao longo dos dias de tratamento. No dia 1 os animais foram pesados antes da administração do tratamento e da cirurgia estereotáxica. Foi realizada ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.

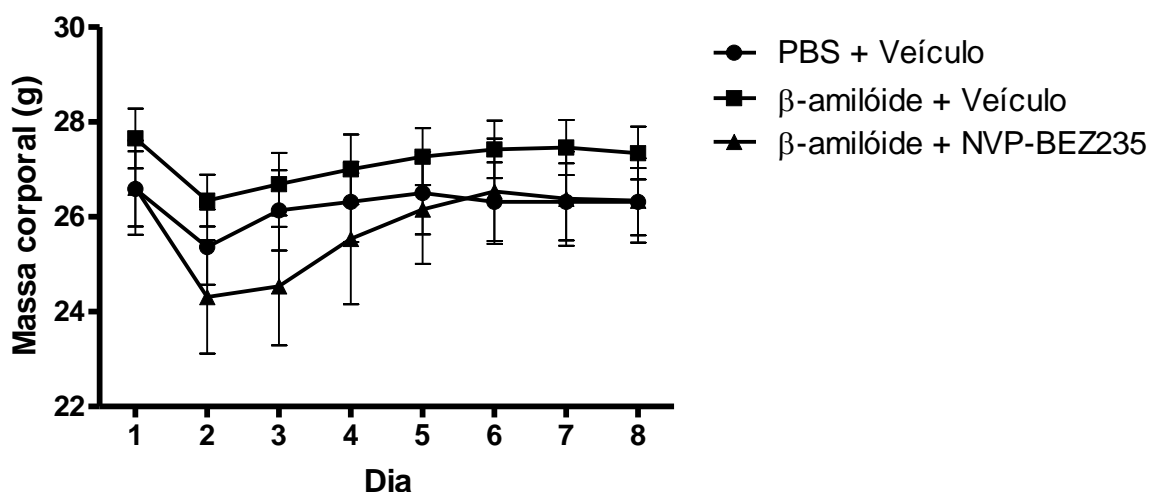


Figura 8: Massa corporal dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=11), β-amilóide + Veículo (n=13) e β-amilóide + NVP-BEZ235 (n=13). No dia 1 os animais foram pesados antes da administração do tratamento e da cirurgia estereotáxica. Foi realizada ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.

4.2 Avaliação da memória através da TRO e distância percorrida pelos animais

Para avaliação da memória, 7 dias após a cirurgia estereotáxica os animais foram submetidos à TRO. Observa-se, na Figura 9 A que houve uma diminuição do índice de reconhecimento dos objetos nos animais do grupo β-amilóide + Veículo ($52,86 \pm 6,127$) (n = 7) em relação aos grupos PBS + Veículo ($64,50 \pm 5,461$) (n = 8) e β-amilóide + Rivastigmina ($64,63 \pm 4,305$) (n = 8), apesar da mesma não ter sido estatisticamente significativa ($p=0,2352$). Além disso, a análise da distância percorrida, demonstrada na Figura 9 B, permitiu avaliar que essa tendência não ocorreu em decorrência de um possível prejuízo locomotor que poderia ter sido induzido pela injeção intra-hipocampal de β-amilóide, já que as distâncias percorridas pelos grupos PBS + Veículo, β-amilóide + Veículo e β-amilóide +

Rivastigmina não foram estatisticamente diferentes ($6,994 \pm 1,173$; $7,236 \pm 1,015$; $9,393 \pm 1,312$, respectivamente).

Em relação ao tratamento com o inibidor dual de PI3K/ mTOR, observa-se que houve uma diminuição significativa do índice de reconhecimento dos objetos nos animais do grupo β -amilóide + Veículo ($47,40 \pm 6,276$) ($n = 10$) em relação aos grupos PBS + Veículo ($70,30 \pm 5,044$) ($p < 0,01$) ($n = 10$) e β -amilóide + NVP-BEZ235 ($71,86 \pm 3,195$) ($p < 0,05$) ($n = 7$). Não houve diferença na distância percorrida entre os tratamentos ($4,397 \pm 0,7258$ m; $5,573 \pm 0,8792$ m; $4,035 \pm 0,5097$ m para PBS + Veículo, β -amilóide + Veículo e β -amilóide + NVP-BEZ235, respectivamente) (Figura 10).

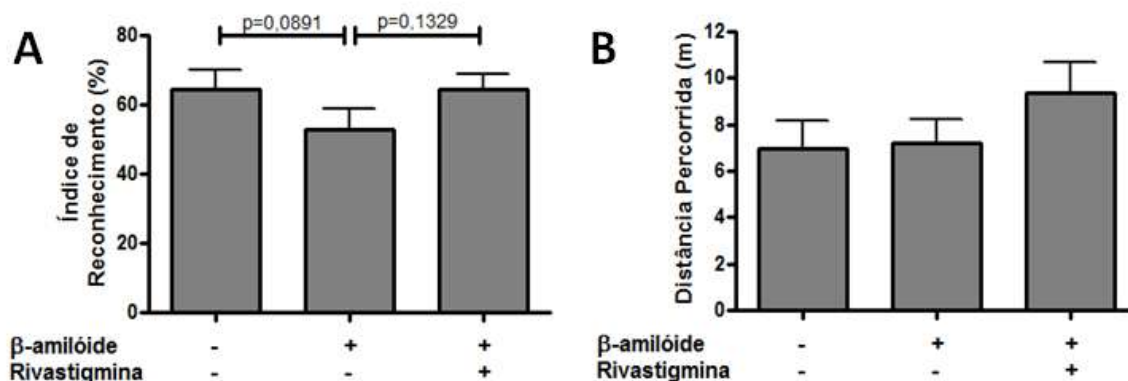


Figura 9: Índice de reconhecimento dos objetos (%) (A) e distância percorrida (B) pelos animais dos grupos PBS + Veículo ($n = 8$), β -amilóide + Veículo ($n = 7$) e β -amilóide + Rivastigmina ($n = 8$). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

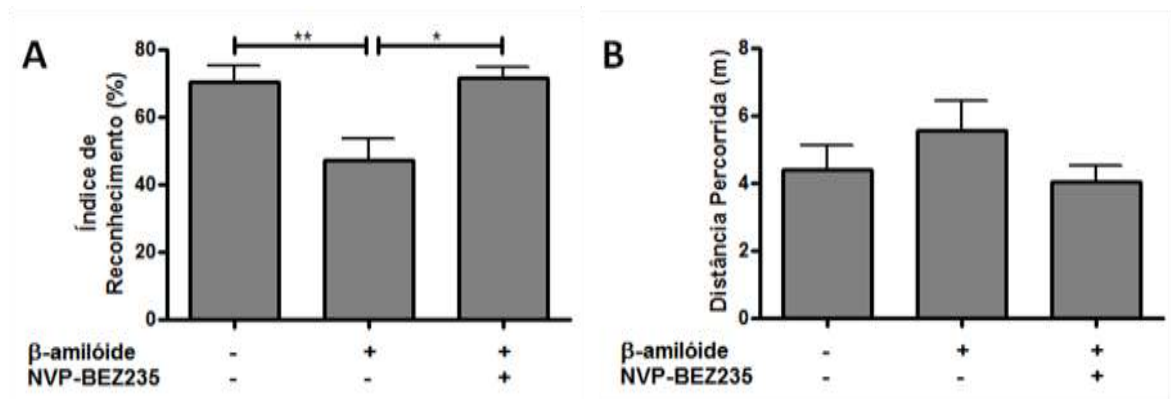


Figura 10: Índice de reconhecimento dos objetos (%) (A) e distância percorrida (B) pelos animais dos grupos PBS + Veículo (n = 10), β-amilóide + Veículo (n = 10) e β-amilóide + NVP-BEZ235 (n = 7). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. *p<0,05; **p<0,01.

4.3 Quantificação da densidade de células marcadas com violeta de cresila

A análise da densidade celular nos hipocampus foi realizada pela marcação com violeta de cresila, e está demonstrada na Figura 11 A. É possível observar uma maior densidade de células marcadas na região CA1 do grupo β-amilóide + NVP-BEZ235 ($578,8 \pm 25,55$) (n = 6) em relação aos grupos PBS + Veículo ($507,7 \pm 2,667$) (n = 4), e β-amilóide + Veículo ($502,2 \pm 8,935$) (n = 5) (Figura 11 B). Além disso, é possível observar uma menor densidade de células marcadas no Giro Denteado e em CA3 do grupo β-amilóide + Veículo ($439,2 \pm 13,79$; $425,3 \pm 9,792$, respectivamente), apesar dessa diferença não ter sido significativa em relação aos grupos PBS + Veículo ($459,5 \pm 10,70$; $433,9 \pm 14,10$, respectivamente) e β-amilóide + NVP-BEZ235 ($461,0 \pm 23,46$; $454,4 \pm 17,98$, respectivamente), conforme observado nos gráficos (Figura 11 C e D).

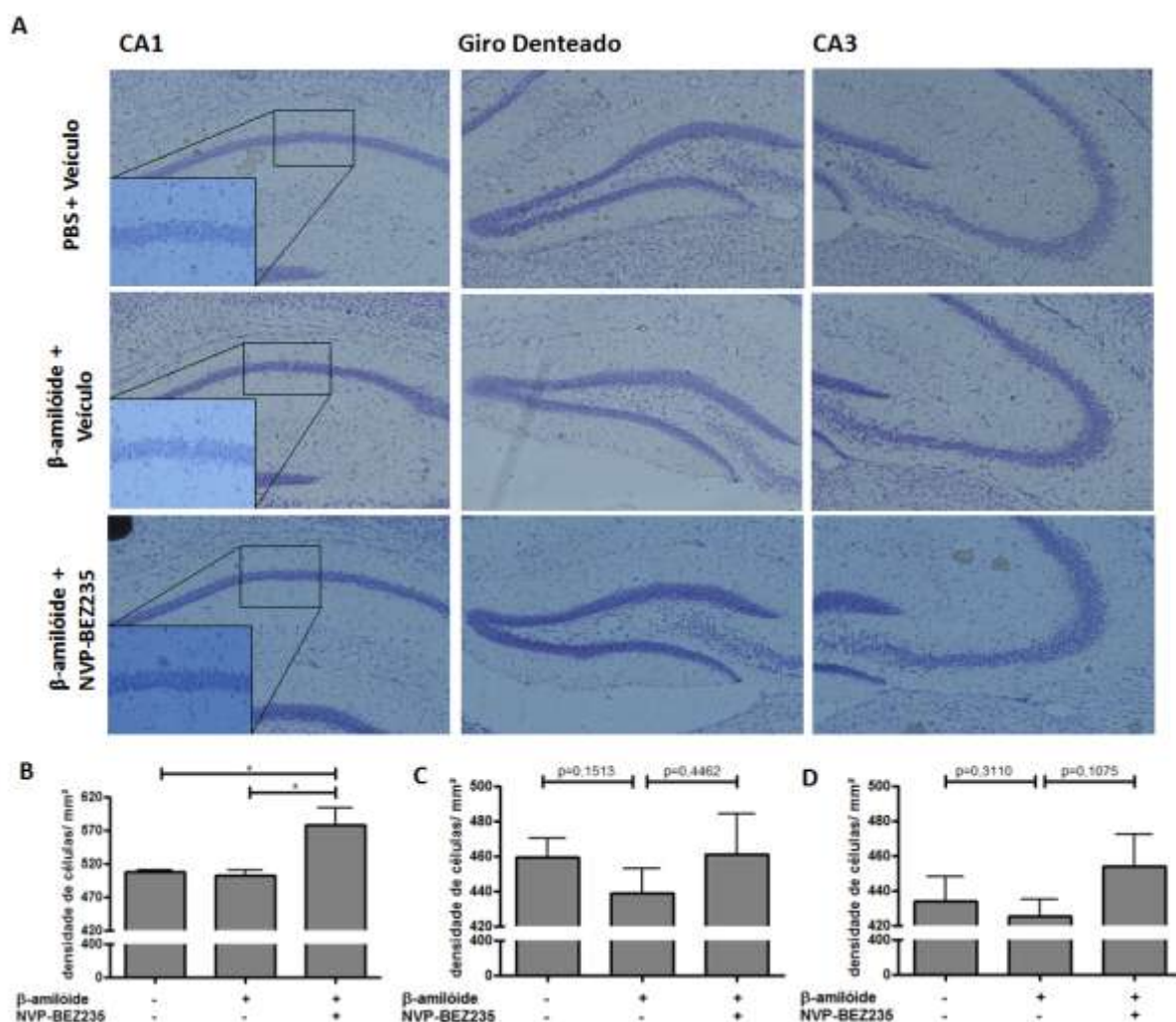


Figura 11: Marcação de neurônios hipocâmpais com Violeta de Cresila (A) e quantificação da densidade celular em diferentes regiões do hipocampo ipsilateral: CA1 (B), Giro Denteado (C) e CA3 (D) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=4), β-amilóide + Veículo (n=5) e β-amilóide + NVP-BE2235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. *p<0,05. Fotografias com aumento de 10 vezes; destaque de CA1 com aumento de 20 vezes.

4.4 Quantificação de células marcadas com Fluoro-Jade® C

A análise de morte neuronal nos hipocâmpos direitos foi realizada pela marcação com FJC, e está demonstrada na Figura 12 A. Observa-se uma maior

quantidade de células fluorescentes das regiões CA1, Giro Denteado e CA3 do grupo β -amilóide + Veículo ($106,5 \pm 38,28$; $47,69 \pm 14,64$; $4,064 \pm 2,514$, respectivamente) ($n = 5$), apesar de essa diferença não ter sido significativa em relação aos grupos PBS + Veículo ($32,89 \pm 21,19$; $20,27 \pm 15,03$; $0,6773 \pm 0,6773$, respectivamente) ($n = 4$) e β -amilóide + NVP-BE235 ($41,14 \pm 6,302$; $14,48 \pm 1,330$; $2,886 \pm 1,158$, respectivamente) ($n = 4$), como observado nos gráficos (Figura 12 B, C e D).

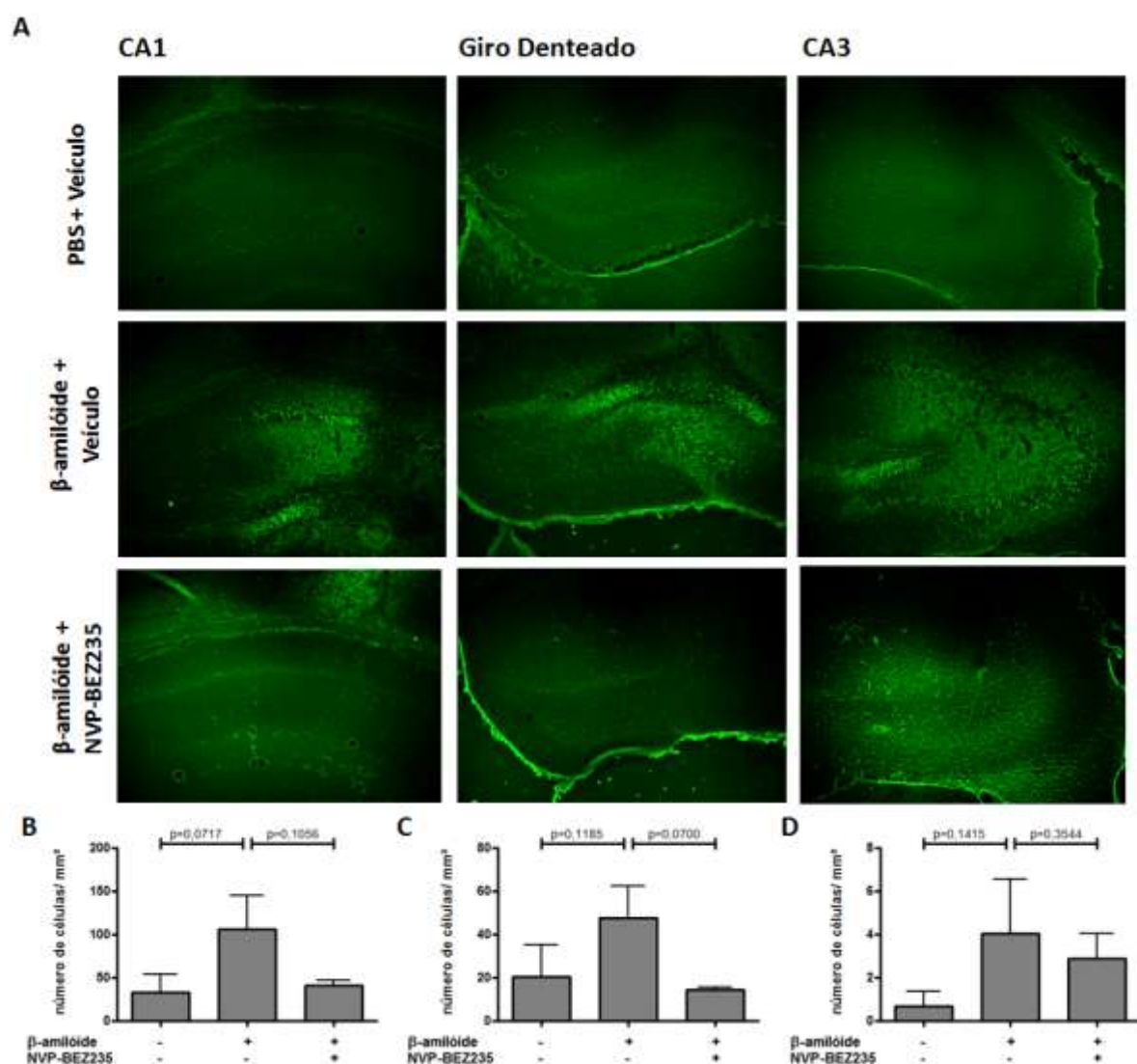


Figura 12: Marcação de neurônios hipocâmpais com FJC (A) e quantificação do número de células em diferentes regiões do hipocampo ipsilateral: CA1 (B), Giro Denteado (C) e CA3 (D) dos animais dos grupos PBS + Veículo ($n=4$), β -amilóide +

Veículo (n=5) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=4). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. Fotografias com aumento de 10 vezes.

4.5 Morte celular induzida em culturas de neurônios hipocampais

Inicialmente foi avaliada a concentração ideal de proteína β -amilóide necessária para indução de morte neuronal *in vitro*. A cultura sem adição de β -amilóide teve uma morte celular (porcentagem) basal de $20,76 \pm 0,6301$ (n = 3); e as culturas com 0,33 (n = 4); 3,3 (n = 4) e 10 μ M (n = 3) de β -amilóide tiveram morte celular de $36,77 \pm 2,924$; $33,68 \pm 3,339$; e $54,01 \pm 5,119$, respectivamente, sendo que as concentrações de 0,33 e 10 μ M de β -amilóide induziram um percentual de morte celular significativamente maior do que o basal (Figura 13).

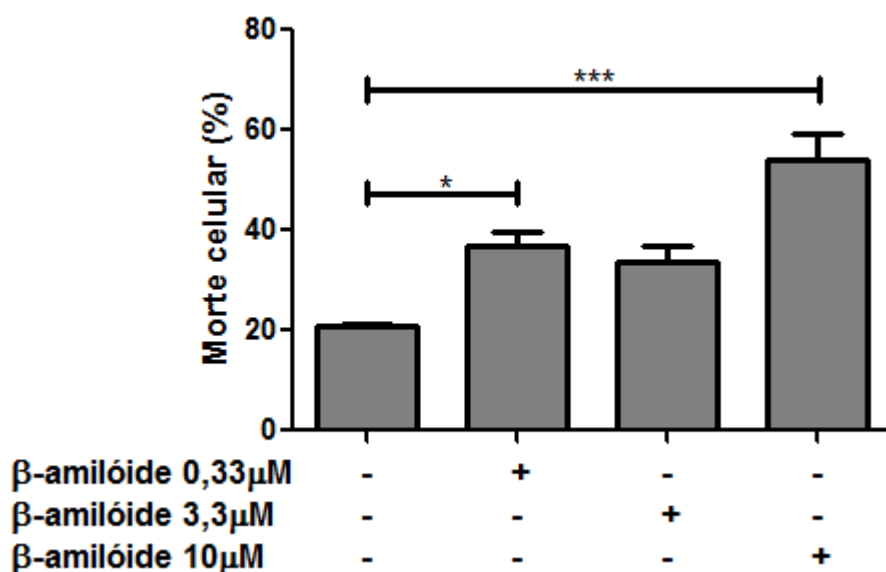


Figura 13: Dose vs resposta de morte celular (%) induzida por β -amilóide em cultura de neurônios nas concentrações de 0,33; 3,3 e 10 μ M. Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnet. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

O percentual de morte celular nas culturas sem β -amilóide foi, de acordo com o tratamento: veículo ($19,26 \pm 1,746$) ($n = 8$), memantina $30 \mu\text{M}$ ($22,8 \pm 1,244$) ($n = 3$), NVP-BEZ235 $20 \mu\text{M}$ ($28,43 \pm 4,540$) ($n = 4$) e NVP-BEZ235 $100 \mu\text{M}$ ($36,46 \pm 11,09$) ($n = 7$). Quando foi adicionada β -amilóide ($10 \mu\text{M}$) às culturas, houve aumento significativo do percentual de morte pelo peptídeo ($51,71 \pm 3,144$) ($n = 7$) em relação ao basal (veículo), revertido significativamente por memantina $30 \mu\text{M}$ ($38,14 \pm 3,166$) ($n = 4$), NVP-BEZ235 $20 \mu\text{M}$ ($28,90 \pm 2,983$) ($n = 4$) e NVP-BEZ235 $100 \mu\text{M}$ ($34,82 \pm 4,980$) ($n = 4$) (Figura 14).

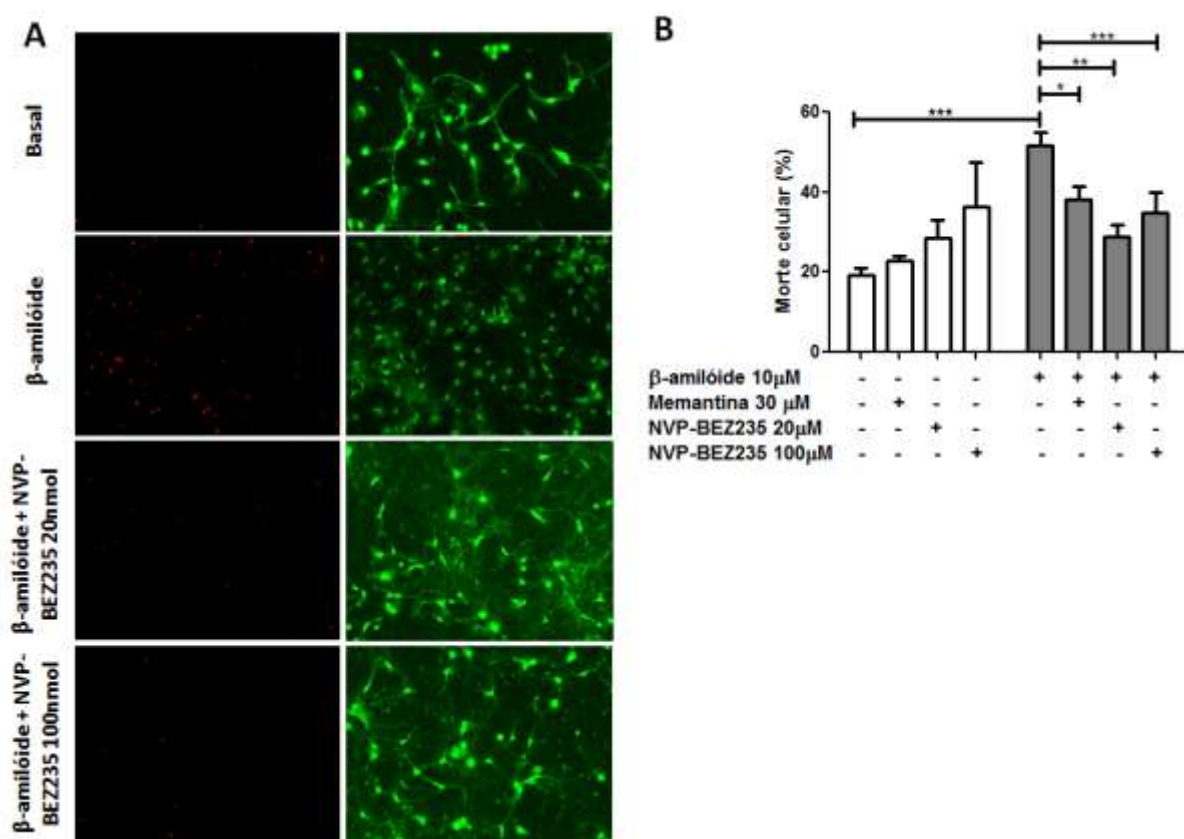


Figura 14: Marcação de células mortas com homodímero de etídeo-1 (em vermelho) e de células viáveis com calceína-AM (em verde) em culturas de neurônios hipocâmpais submetidas a diferentes tratamentos (A) e quantificação da morte celular (%) nos grupos sem β -amilóide: basal ($n = 8$), memantina $30 \mu\text{M}$ ($n = 3$), NVP-BEZ235 $20 \mu\text{M}$ ($n = 4$) e NVP-BEZ235 $100 \mu\text{M}$ ($n = 4$); e com β -amilóide: β -

amilóide (n = 7), memantina 30 μ M (n = 4), NVP-BEZ235 20 μ M (n = 4) e NVP-BEZ235 100 μ M (n = 4) (B). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6 Níveis dos fatores neurotróficos BDNF e NGF

Os níveis dos fatores neurotróficos BDNF e NGF no hipocampo dos animais controles e tratados com rivastigmina e NVP-BEZ235 foram determinados por ELISA. A Figura 15 demonstra que não houve alteração significativa nos níveis de BDNF entre os grupos PBS + Veículo (n=5), β -amilóide + Veículo (n=5) e β -amilóide + Rivastigmina (n=5), tanto no hipocampo ipsilateral (231,2 \pm 20,47; 256,9 \pm 23,41; 210,5 \pm 41,67, respectivamente) quanto no contralateral (234,2 \pm 24,03; 204,2 \pm 21,70; 271,4 \pm 22,34, respectivamente). Além disso, não houve alteração significativa nos níveis de BDNF entre os grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6), tanto no hipocampo ipsilateral (187,8 \pm 16,73; 193,7 \pm 8,438; 193,6 \pm 28,20, respectivamente) quanto no contralateral (189,3 \pm 11,21; 163,3 \pm 11,04; 198,8 \pm 22,98, respectivamente) (Figura 16).

A Figura 17 demonstra que não houve alteração significativa nos níveis de NGF entre os grupos PBS + Veículo (n=5), β -amilóide + Veículo (n=5) e β -amilóide + Rivastigmina (n=5), tanto no hipocampo ipsilateral (80,14 \pm 4,033; 87,70 \pm 10,61; 69,40 \pm 4,279, respectivamente) quanto no contralateral (83,87 \pm 4,570; 68,49 \pm 6,760; 77,35 \pm 3,681, respectivamente). Além disso, não houve alteração significativa nos níveis de BDNF entre os grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6), tanto no hipocampo ipsilateral (18; 65,85 \pm 6,791; 71,35 \pm 2,099; 58,96 \pm 6,277, respectivamente) quanto no

contralateral ($47,35 \pm 1,572$; $64,21 \pm 7,366$; $57,51 \pm 7,116$, respectivamente) (Figura 18).

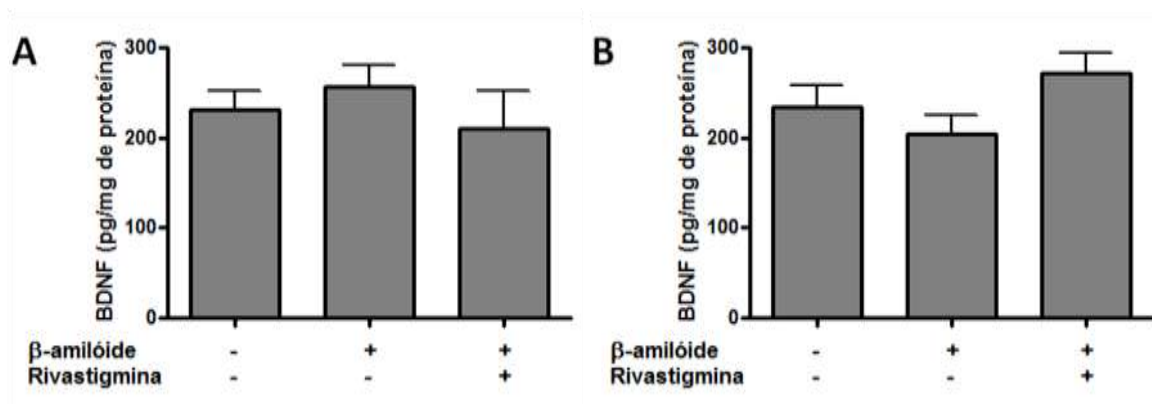


Figura 15: Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=5), β-amilóide + Veículo (n=5) e β-amilóide + Rivastigmina (n=5). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

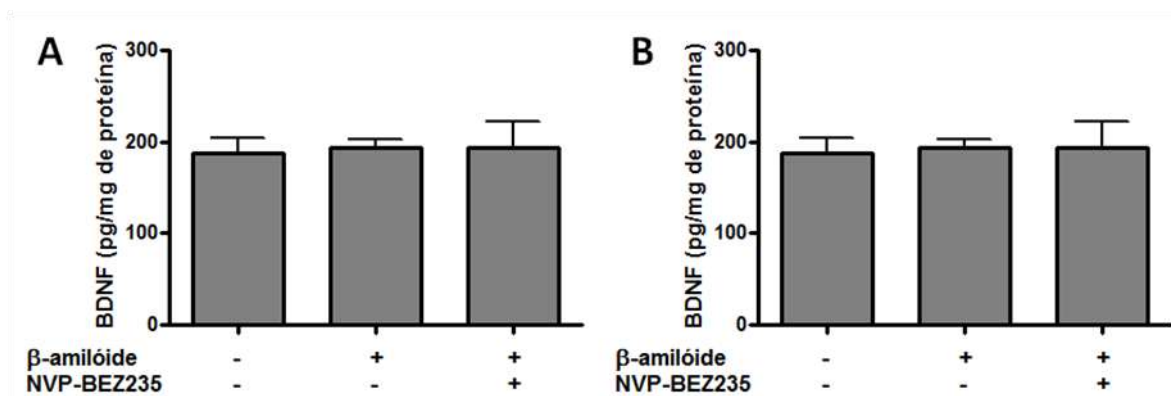


Figura 16: Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β-amilóide + Veículo (n=6) e β-amilóide + NVP-BE2235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

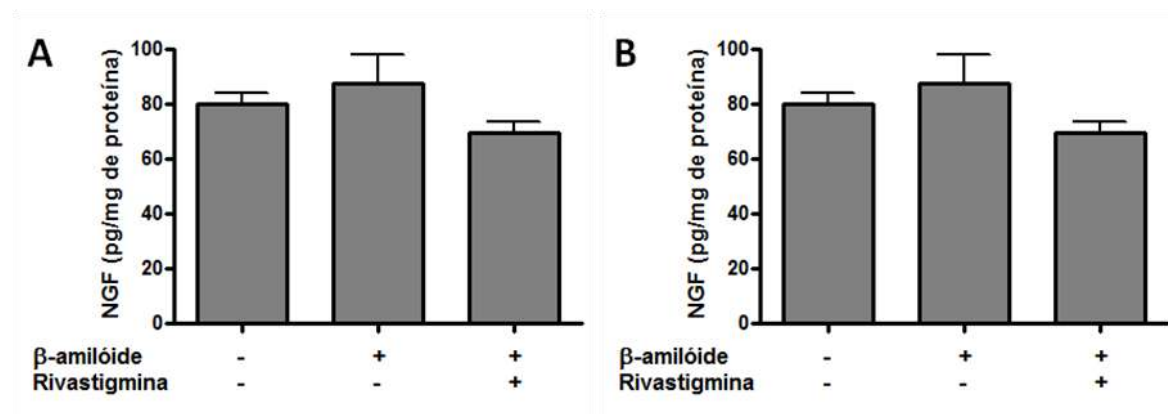


Figura 17: Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=5), β-amilóide + Veículo (n=5) e β-amilóide + Rivastigmina (n=5). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

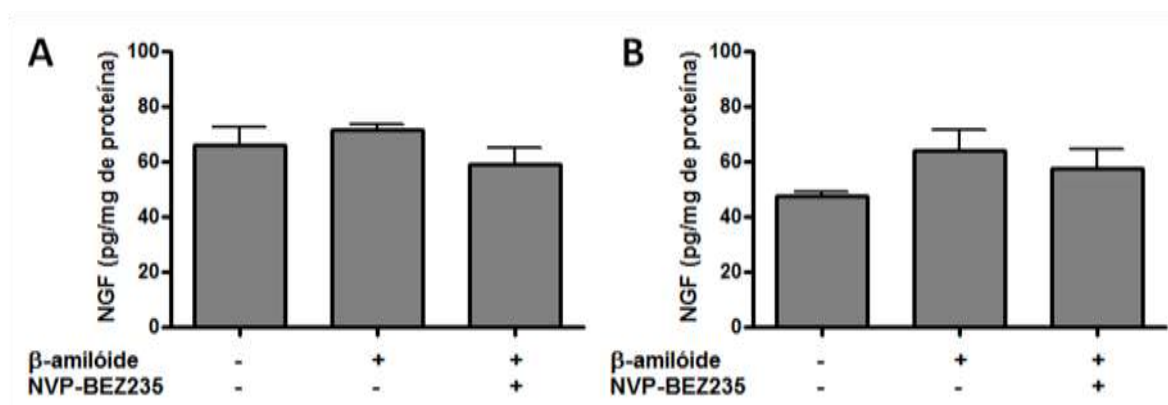


Figura 18: Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β-amilóide + Veículo (n=6) e β-amilóide + NVP-BE2235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

4.7 Níveis das citocinas IL-1β IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ e IL-17A

Os níveis de IL-1β foram determinados por ELISA, e os níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ e IL-17A foram determinados por CBA no hipocampo dos

animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BE235 (n=6). Não houve alteração nos níveis de IL-1 β , IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-17A, tanto no hipocampo ipsilateral quanto no contralateral (Figuras 19 a 23).

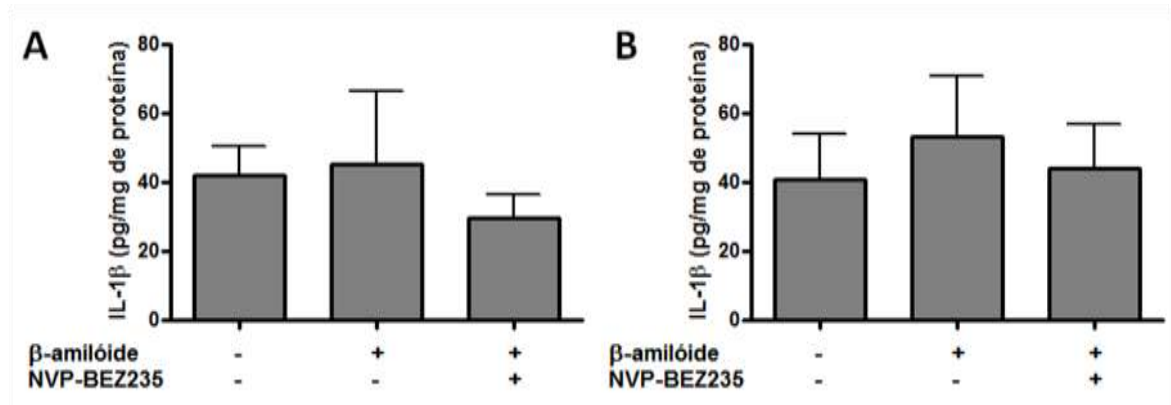


Figura 19: Níveis de IL-1 β (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BE235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

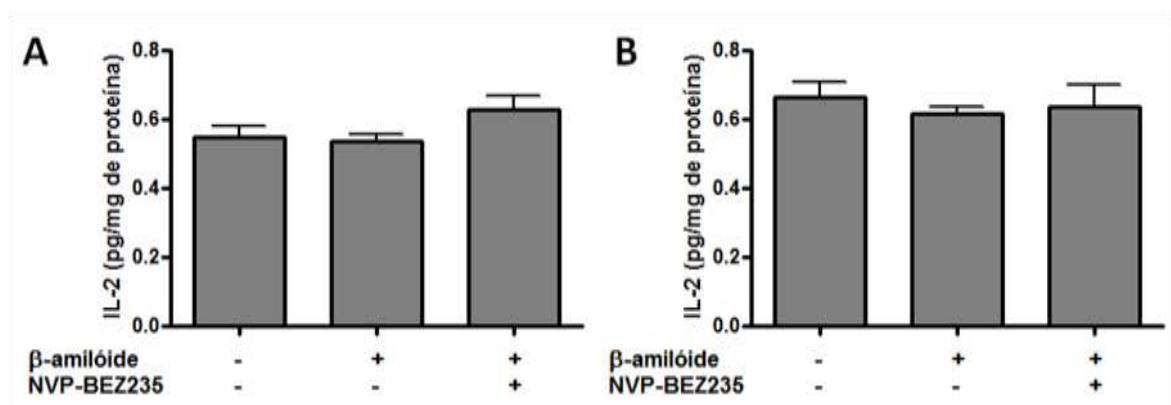


Figura 20: Níveis de IL-2 (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BE235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

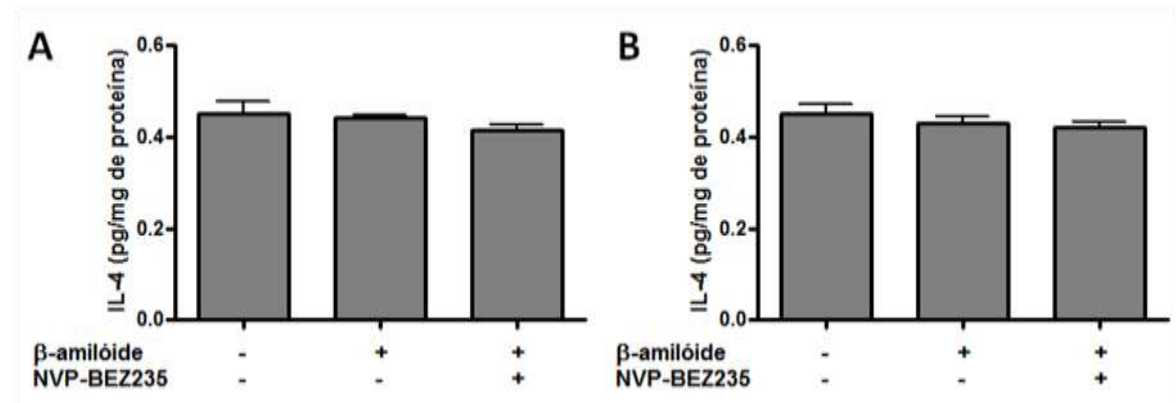


Figura 21: Níveis de IL-4 (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β-amilóide + Veículo (n=6) e β-amilóide + NVP-BE235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

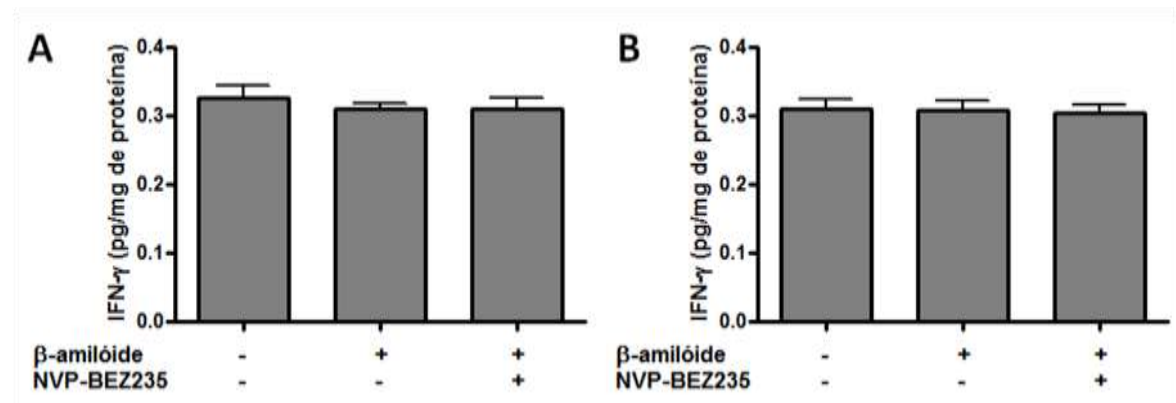


Figura 22: Níveis de IFN-γ (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β-amilóide + Veículo (n=6) e β-amilóide + NVP-BE235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

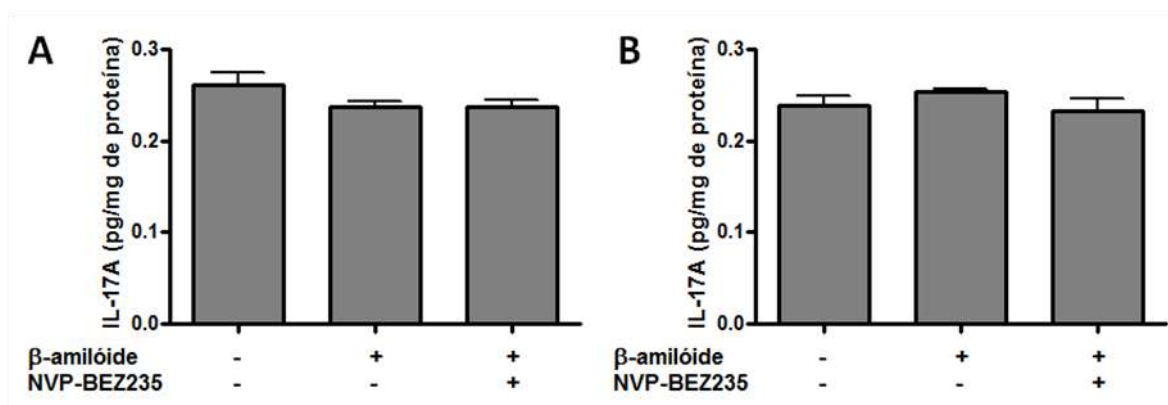


Figura 23: Níveis de IL-17A (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β-amilóide + Veículo (n=6) e β-amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Há um aumento de IL-6 no hipocampo ipsilateral dos animais do grupo β-amilóide + NVP-BEZ235 ($0,5400 \pm 0,1906$) ($p=0,0793$) em relação aos grupos PBS + Veículo e β-amilóide + Veículo ($0,2000 \pm 0,01703$; $0,1805 \pm 0,007173$, respectivamente). Não houve diferença significativa nos níveis de IL-6 entre os grupos PBS + Veículo, β-amilóide + Veículo e β-amilóide + NVP-BEZ235, no hipocampo contralateral ($0,2075 \pm 0,01065$; $0,1857 \pm 0,007513$; $0,1854 \pm 0,006313$, respectivamente) (Figura 24). Também há um aumento de TNF-α no hipocampo ipsilateral dos animais do grupo β-amilóide + NVP-BEZ235 ($0,7912 \pm 0,2716$) ($p=0,0559$) em relação aos grupos PBS + Veículo e β-amilóide + Veículo ($0,2660 \pm 0,02311$; $0,2383 \pm 0,01049$, respectivamente). Não houve diferença significativa nos níveis de TNF-α entre os grupos PBS + Veículo, β-amilóide + Veículo e β-amilóide + NVP-BEZ235, no hipocampo contralateral ($0,2810 \pm 0,02759$; $0,2645 \pm 0,02324$; $0,2482 \pm 0,01891$, respectivamente) (Figura 25).

A Figura 26 demonstra que houve alteração significativa nos níveis de IL-10 entre os grupos PBS + Veículo, β -amilóide + Veículo e β -amilóide + NVP-BE235, no hipocampo ipsilateral ($0,4266 \pm 0,07674$; $0,2623 \pm 0,03297$; $0,7176 \pm 0,1084$, respectivamente), o que não ocorreu no hipocampo contralateral ($0,3675 \pm 0,06807$; $0,4124 \pm 0,1387$; $0,5420 \pm 0,1073$, respectivamente).

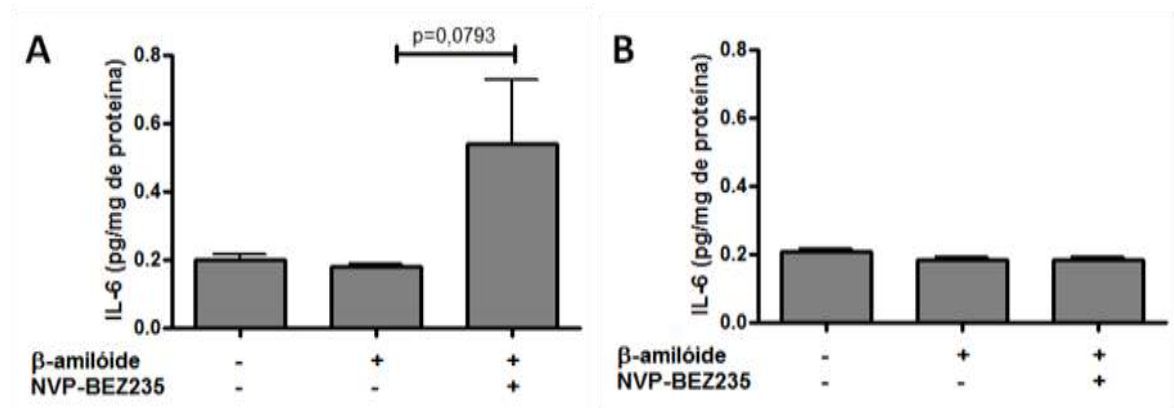


Figura 24: Níveis de IL-6 (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BE235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

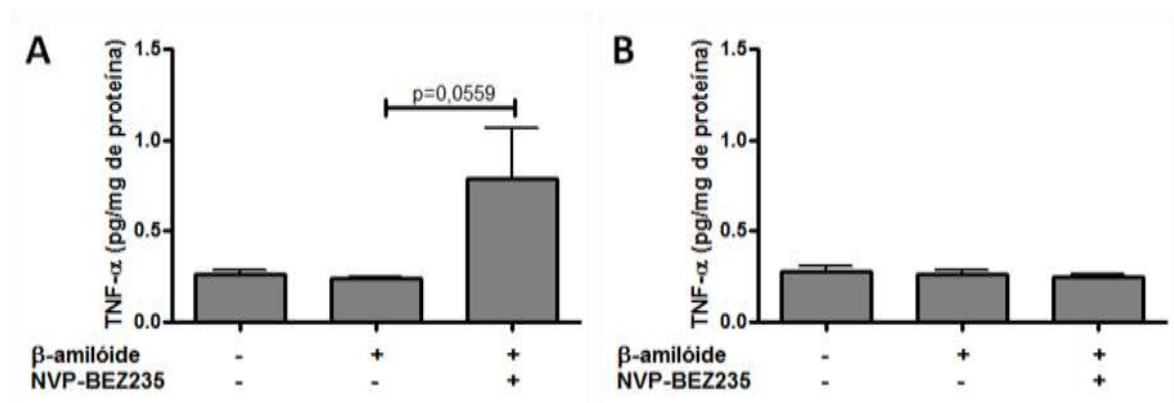


Figura 25: Níveis de TNF- α (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo

(n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

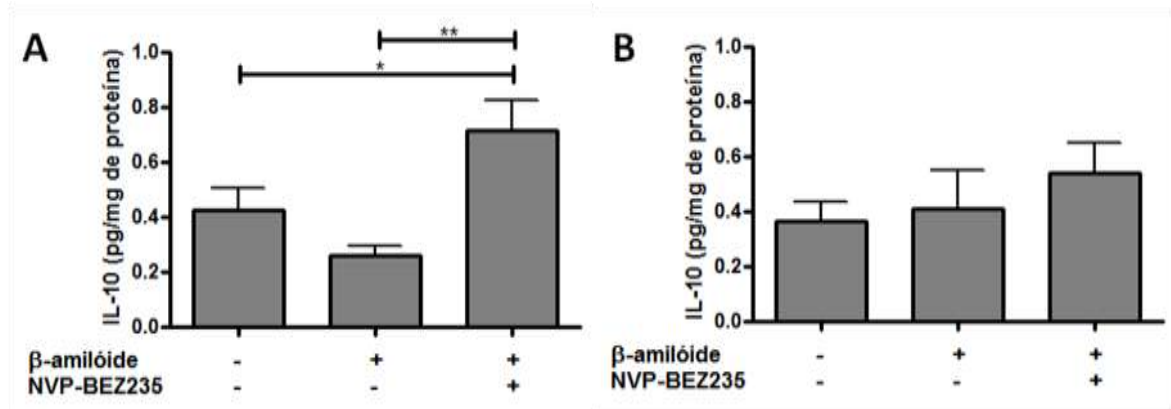


Figura 26: Níveis de IL-10 (pg/mg de proteína total) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) dos animais dos grupos PBS + Veículo (n=6), β -amilóide + Veículo (n=6) e β -amilóide + NVP-BEZ235 (n=6). Foi realizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. *p<0,05; **p<0,01.

5. DISCUSSÃO

A progressão da DA, associada com seus comprometimentos cognitivos, leva à morte em cerca de 3 a 9 anos após o diagnóstico (QUERFUTH, LAFERLA, 2010). Apesar de a doença ter sido descrita a primeira vez há mais de um século, nos últimos anos não foi desenvolvida nenhuma droga eficaz no seu tratamento. Um dos fatores responsáveis pela ausência de tratamento pode ser devido ao fato de seus mecanismos fisiopatológicos não estarem completamente elucidados (GREENFIELD, 2013).

A via PI3K/ Akt/ mTOR possui importante papel de sinalização na integração da sinalização sináptica (KITAGISHI et al., 2012). A β -amilóide é capaz de ativar a via PI3K, através da qual pode promover neurotoxicidade (ZHANG et al., 2011). A inibição dessa via, como alvo terapêutico, é uma medida para controlar o ciclo celular, como em casos de tumores. Algumas doenças neurodegenerativas, a exemplo da DA, podem ser beneficiadas pela inibição dessa via de sinalização (MAIESE et al., 2012). Dessa forma, decidimos avaliar os efeitos de um inibidor dual de PI3K/ mTOR sobre efeitos comportamentais, bioquímicos e histológicos induzidos por $A\beta_{1-42}$.

O NVP-BEZ235 é um fármaco que se encontra em teste clínico de fase I/ II para tratamento de tumores sólidos (MUCKHERJEE et al., 2012; CLINICALTRIALS.GOV, 2014). De acordo com Masuda e colaboradores (2011), o tratamento com NVP-BEZ235 em modelo murino de carcinoma hepatocelular não induz perda de massa corporal significativa, quando comparada à perda em camundongos não tratados, ao longo de 11 dias de tratamento.

No modelo apresentado no presente estudo não há redução significativa da massa corporal dos animais tratados com o inibidor dual de PI3K/ mTOR em comparação aos animais controle, corroborando os dados já descritos na literatura..

Conforme descrito anteriormente, o principal sinal da DA é a perda de memória recente. Dessa forma, decidimos avaliar o comportamento cognitivo dos camundongos submetidos ao modelo de Alzheimer através da TRO. A concentração de NVP-BEZ235 utilizada (25 mg/Kg) foi capaz de reverter o comprometimento cognitivo induzido por β -amilóide. A dose utilizada está dentro de uma faixa de doses relatadas para investigação de sua atuação como anti-tumoral, a qual varia de 12,5 mg/ Kg a 50 mg/ Kg (SERRA et al., 2008; CAO et al., 2009b; YANG et al., 2013; SUNEAGA et al., 2014). Entretanto, é a primeira vez que a atividade do fármaco é descrita em teste cognitivo. A rivastigmina foi utilizada como fármaco controle, uma vez que é utilizada na clínica para tratamento da DA. Apesar de não ter sido observada diferença estatística no teste realizado com a droga, há forte tendência de diminuição do índice de reconhecimento pela β -amilóide ($p = 0,0891$) e de reversão pela rivastigmina ($p=0,1329$).

O déficit cognitivo induzido por β -amilóide é relatado por diferentes autores. Martinez-Coria e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos transgênicos 3xTg-AD apresentaram déficits de memória no labirinto aquático de Morris (MWM, *Morris Water Maze*), que foi revertido pela memantina, utilizada no tratamento da DA. O déficit de memória no MWM também foi demonstrado em modelo de administração i.c.v. de β -amilóide 1-40 (PASSOS et al., 2010). Moon e colaboradores (2011) verificaram que a administração intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$ induz déficit cognitivo, verificado através do labirinto em Y e da esQUIVA passiva, 6 e 8 dias após a infusão, respectivamente. Furukawa-Hibi e colaboradores (2011)

observaram a diminuição no índice de reconhecimento na TRO, em animais submetidos à injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de β -amilóide 1-40, e a reversão por rivastigmina e donepezila. Meunier e colaboradores (2006) apontaram déficits de memória no labirinto em Y e na esQUIVA passiva, em animais submetidos à injeção i.c.v. de β -amilóide 25-35, e a reversão por donepezila, tacrina, rivastigmina e galantamina. Somando-se a esses estudos, Zhang e colaboradores (2013a) demonstraram pelo MWM que o déficit cognitivo é dependente da progressão da patologia. O presente trabalho corrobora os dados presentes na literatura, uma vez que pudemos verificar um comprometimento da memória induzido por β -amilóide na TRO, e uma melhora da cognição pelo anti-colinesterásico rivastigmina, mesmo o déficit cognitivo induzido com amilóide- β não sendo estatisticamente significativo.

Ainda, Passos e colaboradores (2010) demonstraram que o AS605240, um inibidor de PI3K é capaz de prevenir o déficit de aprendizado no MWM sem prejuízo da atividade locomotora dos animais, em modelo de DA induzido por administração i.c.v. de β -amilóide 1-40. Esses autores demonstraram um aumento da fosforilação de Akt induzida pelo peptídeo, o que representa um aumento da ativação da mesma (PASSOS et al., 2010). O inibidor de PI3K/ mTOR utilizado no presente estudo apresentou perfil semelhante, ao também reverter o déficit cognitivo, o que foi demonstrado através da TRO. Esses resultados demonstram que a inibição da via PI3K/ Akt/ mTOR está envolvida com uma melhora cognitiva em modelos de DA.

Dessa forma, o comprometimento cognitivo induzido por modelos experimentais está bem descrito na literatura, assim como a melhora promovida por fármacos utilizados na clínica para tratamento da DA. Assim como Passos e colaboradores (2010) demonstraram, foi verificado no presente trabalho que a inibição da via PI3K é capaz de promover melhora cognitiva em modelo experimental

de DA. Sendo assim, a droga testada pode ter potencial para uso clínico no tratamento da doença, sendo necessária ainda a avaliação de outros parâmetros associados ao seu mecanismo de ação e sua atuação na fisiopatologia do Alzheimer.

Na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos no efeito cognitivo do NVP-BEZ235, e tendo em vista que a DA é uma doença neurodegenerativa, foram realizadas análises histológicas para verificar a viabilidade e morte de neurônios hipocâmpais, bem como ensaio de morte celular em cultura neurônios de hipocampo.

O violeta de cresila marca as inclusões denominadas corpúsculos de NISSL em células viáveis, possuindo alta especificidade para neurônios. Levando em consideração trabalhos descritos na literatura, é possível verificar que na análise que CANAS e colaboradores (2009) realizaram do hipocampo de ratos Wistar 2 dias ou 2 semanas após a injeção de $A\beta_{1-42}$ i.c.v., foi verificada uma preservação da marcação dos corpúsculos de NISSL com violeta de cresila. Entretanto, os pesquisadores encontraram aparente sinaptotoxicidade, pela perda dos terminais nervosos, demonstrando que a mesma pode ser o primeiro evento a ocorrer na DA e, conseqüentemente, iniciar os déficits cognitivos. Já o resultado obtido por Moon e colaboradores (2011) demonstra que, 8 dias após a injeção intrahipocâmpal de $A\beta_{1-42}$, há diminuição significativa da densidade de células viáveis no giro denteado e em CA3 do hipocampo, verificada pela marcação através da técnica de NISSL em camundongos ICR.

No presente trabalho, não houve diferença estatística da densidade de células marcadas com violeta de cresila entre os grupos avaliados, no giro denteado e em CA3 do hipocampo. Entretanto foi verificada uma tendência de diminuição da

densidade de neurônios no giro denteado e em CA3, 7 dias após a administração intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$, nos animais tratados com veículo, bem como uma reversão pelo tratamento com NVP-BEZ235. Já na região CA1 do hipocampo, apesar da injeção de β -amilóide não ter diminuído a densidade de células viáveis, o NVP-BEZ235 aumentou significativamente a densidade celular após 7 dias de tratamento. Isso indica que a melhora cognitiva pode estar relacionada com um possível papel neurotrófico da inibição de PI3K/ mTOR.

No mesmo trabalho citado anteriormente, CANAS e colaboradores (2009) também verificaram a ausência de perda neuronal pela marcação com FJC. Já Bernal-Mondragón e colaboradores (2013) detectaram a presença de marcação com FJC no hipocampo de ratos Wistar nos tempos de 24 h, 8 dias e 15 dias após a injeção i.c.v. de β -amilóide 25-35. Corroborando esses dados, Wang e colaboradores (2012) também verificaram um aumento significativo do número de células marcadas com FJC após a infusão de β -amilóide no núcleo caudado de ratos Sprague-Dawley. De acordo, no presente trabalho foi possível verificar uma forte tendência de aumento na marcação com FJC em CA1, giro denteado e CA3, do hipocampo ipsilateral, 7 dias após a administração intra-hipocampal de $A\beta_{1-42}$, nos animais que foram tratados com veículo, e uma reversão através do tratamento com NVP-BEZ235. Apesar de essa diferença não ter sido significativa, o número de cortes analisados por grupo (4 a 6) foi pequeno, o que implica em um maior rigor estatístico. Portanto, deveria ser realizada uma análise com um número maior de animais, a fim de retratar melhor as alterações presentes nos grupos.

Reforçando os resultados encontrados, o tratamento de culturas de neurônios hipocampais com $A\beta_{1-42}$ induz significativa diminuição na viabilidade celular (SANPHUI, BISWAS, 2013). Ye e Zhang (2012) também relatam a diminuição da

viabilidade e o aumento da morte celular provocados pelo mesmo peptídeo em culturas de neurônios hipocâmpais. Esses autores demonstram também o aumento de espécies reativas do oxigênio em culturas tratadas com β -amilóide. Huang e colaboradores (2012), além de corroborarem a diminuição da viabilidade celular provocada por β -amilóide, em culturas de neurônios corticais, também demonstram elevação nos níveis de IL-1 β . Somando-se a esses resultados, Bhaskar e colaboradores (2009) observaram níveis elevados de PI3K, Akt e mTOR em culturas de neurônios tratados com β -amilóide.

Em nosso trabalho, o tratamento de culturas de neurônios hipocâmpais com diferentes concentrações de A β ₁₋₄₂ permitiu verificar que o aumento da concentração do peptídeo aumenta o percentual de células mortas em relação a células viáveis. A concentração escolhida, de 10 μ M, induziu morte de aproximadamente 52%. Tanto a memantina quanto o inibidor dual de PI3K/ mTOR, nas 2 concentrações testadas, reduziram a morte neuronal induzida por β -amilóide. Desta forma, a partir dos resultados obtidos com a coloração do corpúsculo de NISSL, marcação com FJC e ensaio de morte celular em cultura de neurônios hipocâmpais, é possível perceber que a neurodegeneração exercida pela β -amilóide envolve o processo de morte celular, e que o NVP-BEZ235 é capaz de prevenir ou reduzir esse processo.

Com o objetivo de se verificar se os mecanismos de neurodegeneração da β -amilóide e neuroproteção induzida pela droga foram mediados por fatores neurotróficos, foram medidos os níveis de BDNF e NFG. Essas neurotrofinas promovem proliferação, diferenciação e sobrevivência de neurônios e de células da glia, além de mediar aprendizado, formação de memória e respostas comportamentais. Os níveis normais dos receptores de neurotrofinas estão

diminuídos nos neurônios colinérgicos em estágios avançados da DA (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

O NGF é o principal fator de crescimento no combate à morte de neurônios colinérgicos, e já foi descrito o seu aumento no CSF de pacientes com DA (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008). O tratamento com NGF em animais submetidos a modelo de DA aprimora a cognição e o metabolismo cerebral (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

Pacientes com DA possuem níveis de BDNF hipocampal e cortical significativamente reduzidos, e algumas evidências sugerem que isso é decorrente do acúmulo de β -amilóide. Culturas de neurônios corticais tratadas com β -amilóide também possuem níveis da neurotrofina diminuídos (CASTELLO et al., 2012). Essa diminuição, no entanto, parece ser dependente da idade e evolução da patologia, com deposição das placas de β -amilóide (NAERT, RIVEST, 2012). Somando-se a isso, o tratamento com BDNF em modelos animais de DA é capaz de melhorar a função sináptica, a formação de memória e a sobrevivência neuronal (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

No presente trabalho, entretanto, não foram encontradas alterações nos níveis de BDNF e NGF, nem após injeção de β -amilóide, nem com o tratamento com NVP-BEZ235, 7 dias após a administração do peptídeo. Esse resultado pode estar associado, conforme citado anteriormente, ao tempo, já que a diminuição das neurotrofinas está associada com o curso da DA.

Além dos fatores neurotróficos, estímulos pró-inflamatórios tem sido descritos como fatores que exacerbam a neuropatologia da DA, por aumentar o processamento amiloidogênico de APP e aumentar a morte neuronal. Por outro lado, sugere-se que as citocinas anti-inflamatórias sejam agentes neuroprotetores, que

reduzem a neuroinflamação e reduzem a deposição de β -amilóide (CHAKRABARTY et al., 2012). O processo inflamatório na DA pode gerar um aumento de citocinas pró-inflamatórias (HURLEY, TIZABI, 2013). Citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, levam à supressão da resposta pró-inflamatória em macrófagos, microglia, células T e astrócitos. Recentemente, foi demonstrado que estas citocinas aumentam a degradação de β -amilóide através da fagocitose, e diminuem a morte celular induzida pelo peptídeo, tanto em camundongos transgênicos, quanto em culturas de células da glia (CHAKRABARTY et al., 2012). Na DA, a desregulação do balanço entre citocinas pró- e anti-inflamatórias pode levar a um aumento de citocinas no SNC e o sinergismo de sua ação, induzindo amplificação da ativação celular e citotoxicidade (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008).

A IL-2 desencadeia proliferação celular, atividade citotóxica e liberação de citocinas como IFN- γ (LYONS et al., 2011). Conforme demonstrado por Cao e colaboradores (2009a), IL-2 sérico está aumentado em modelo murino transgênico de DA. O IFN- γ é uma citocina que está implicada tanto no dano quanto no reparo neuronal, através da ativação da micróglia (BARON et al., 2008). O aumento de IFN- γ já foi demonstrado no soro de camundongos transgênicos para DA (CAO et al., 2009a). IFN- γ também está aumentado no hipocampo de ratos que receberam injeção i.c.v. de β -amilóide (LYONS et al., 2011). Baron e colaboradores (2008) demonstraram que o IFN- γ , quando tem sua expressão diminuída, aumenta a neurogênese no giro denteado de camundongos adultos, além de aumentar o aprendizado espacial e a performance em testes de memória. Yamamoto e colaboradores (2007) demonstraram, em coculturas de micróglia e astrócitos transgênicos para APP, o aumento da produção de IFN- γ , o qual, por sua vez, induz a secreção de TNF- α . Associadas, essas citocinas promovem um aumento na

produção de β -amilóide. Além disso, em modelo murino de DA sem a expressão de IFN- γ , esses autores demonstraram redução de gliose e das placas amilóides.

A IL-17A é importante na modulação do curso de doenças inflamatórias. Conforme demonstrado por Zimmermann e colaboradores (2013), a expressão astrogliar de IL-17A no SNC de camundongos provoca astrogliose, ativação microglial e ausência de infiltração parenquimal de células imunes no SNC. Além disso, a estimulação desses animais com LPS provocou uma indução aumentada de citocinas pró-inflamatórias. Em modelos animais transgênicos para DA, a IL-17 está significativamente aumentada (JIN et al., 2008). Conforme Zhang e colaboradores demonstraram (2013a), a IL-17 está aumentada no hipocampo, no CSF e no soro, 7 e 14 dias após infusão bilateral de A β ₁₋₄₂.

No presente trabalho, no entanto, nenhuma alteração significativa pode ser verificada nos níveis de IL-2, IFN- γ e IL-17A nos hipocampos dos animais após a injeção de β -amilóide, nem com o tratamento com o inibidor de PI3K/ mTOR.

A IL-1 β desempenha importante papel na neurodegeneração (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008). De acordo com Giovannini e colaboradores (2002), a estimulação de vias de sinalização microgliais por β -amilóide estão ligadas à produção de IL-1 β . O aumento dos níveis de IL-1 β hipocampal já foi demonstrado em ratos 7 dias após a infusão i.c.v. de β -amilóide 25-35 em ratos Sprague Dawley (JIN et al., 2005) e de A β ₁₋₄₂ em ratos Wistar (ZHANG et al., 2013b). Conforme demonstrado por Ross e colaboradores (2003), essa citocina é importante para que ocorra a LTP, entretanto, em altas concentrações, ela pode inibir a LTP. A IL-1 β é também importante para o aprendizado e, conforme demonstrado por Brennan e colaboradores (2003), em baixas concentrações aumenta a performance de ratos na esQUIVA passiva. No presente trabalho, entretanto, não houve alteração na

expressão de IL-1 β 7 dias após a infusão de β -amilóide intra-hipocampal, tanto nos animais tratados quanto nos não tratados. A manutenção dos níveis da citocina pode ter contribuído para facilitar a formação de memória. Entretanto, nos camundongos tratados com β -amilóide, os níveis de IL-1 β parecem não ter influenciado no aspecto cognitivo.

A IL-4 já foi caracterizada como um potencial modulador de atividades neuronais no cérebro (KYIOTA et al., 2010). Essa citocina conduz a resposta de células Th2, medeia o recrutamento e ativação de mastócitos, estimula a produção de Imunoglobulina E e inibe a expressão e liberação de IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 e IFN- γ , exercendo efeito neuroprotetor (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008). A diminuição da ativação de receptores de IL-4 contribui para disfunções cognitivas relacionadas ao envelhecimento. O tratamento com IL-4 restabelece a função sináptica em ratos após a infusão i.c.v. de β -amilóide (CHAKRABARTY et al., 2012) e atenua a deficiência na LTP provocada pela β -amilóide, assim como a expressão da IL-1 β no hipocampo. Além disso, a estimulação de macrófagos e micróglia humanos com IL-4 aumenta a degradação de β -amilóide (KYIOTA et al., 2010).

Conforme demonstrado por Kyiota e colaboradores (2010), a expressão de IL-4 no hipocampo de camundongos transgênicos APP + PS1 atenua a patologia da DA, reduzindo astro e microgliose, oligomerização e deposição da β -amilóide, aumentando da neurogênese e melhorando o aprendizado espacial. De acordo com Shimizu et al (2008), a adição de IL-4 a culturas de micróglia tratadas com β -amilóide também leva à degradação do peptídeo. Entretanto, a super-expressão de IL-4 no hipocampo de camundongos transgênicos para APP, demonstrada por Chakrabarty e colaboradores (2012), agrava a deposição de placas de β -amilóide no cérebro dos animais, possivelmente devido a uma redução de resposta inflamatória

e consequente diminuição da fagocitose pela glia. Conforme Cao e colaboradores (2009a) demonstraram, há aumento dessa citocina no soro de camundongos transgênicos para APP e PS-1. No presente trabalho não foram encontradas alterações na expressão de IL-4 entre os grupos analisados.

O TNF- α tem papel central tanto no início quanto na regulação da cascata de produção de citocinas durante a resposta inflamatória. Na DA, é predominantemente produzido pela micróglia (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008). Conforme demonstrado por Zhang e colaboradores, (2013b), há aumento significativo nos níveis de TNF- α em animais 7 dias após injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₂. Já foi demonstrado um papel neuroprotetor da citocina na DA contra a toxicidade provocada por glutamato, radicais livres e β -amilóide, em culturas de neurônios (AKIYAMA et al., 2000; RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008). Além disso, a ausência de receptores tipo 2 de TNF- α compromete o aprendizado na TRO, a memória espacial e a performance na tarefa de medo condicionado, em camundongos adultos (NAUDE et al., 2014). A ausência de receptores para TNF- α em camundongos transgênicos para DA exacerba as características da doença relacionadas com acúmulo de β -amilóide e tau, além de diminuir a capacidade fagocítica da microglia. Por outro lado, vários autores demonstram a participação de TNF- α na neuroinflamação presente na DA. Tweedie e colaboradores (2012) verificaram que a diminuição farmacológica da síntese de TNF- α reverte o prejuízo cognitivo, a ativação microglial e a neurodegeneração induzidos por β -amilóide. Além disso, esses autores verificaram que o tratamento crônico com esse inibidor da síntese de TNF- α reduziu a hiperfosforilação da tau, a APP, a β -amilóide e o número de placas, além de reduzir o déficit de memória e aumentar os níveis de proteínas sinápticas. McAlpine e colaboradores (2009) demonstraram que a inibição da sinalização de

TNF- α em camundongos transgênicos para DA pode diminuir o acúmulo de β -amilóide. Somando-se a isso, em estudo piloto de um inibidor de TNF- α , foi demonstrado que a inibição farmacológica da citocina em pacientes com DA promove melhorias cognitivas (TOBINICK et al., 2006). Desta forma, o papel de TNF- α em DA é controverso e novos estudos são necessários com o objetivo de se verificar a função desta citocina nesta condição patológica.

No presente trabalho, não foi detectada alteração de TNF- α nos animais após a injeção do peptídeo, contrariando alguns resultados presentes na literatura. Esse resultado pode ser devido a um aumento gradual da citocina, que não pôde ser observado no período utilizado no experimento, ou à concentração do peptídeo administrada e tempo necessário para desenvolvimento dos parâmetros associados à DA. Já os animais tratados com NVP-BEZ235 apresentaram um aumento de TNF α no hipocampo injetado com β -amilóide ($p=0,0559$). Levando em consideração que baixas doses da citocina podem causar melhorias cognitivas, conforme demonstrado por Brennan e Tieder III (2006) na esQUIVA, o aumento da citocina no presente trabalho pode estar relacionado com a melhoria na performance dos animais na TRO.

Diferentes estudos demonstraram que IL-6 possui efeitos neurotróficos nos neurônios, promovendo astrogliose, ativando micróglia e estimulando a produção de proteínas de fase aguda (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008). A IL-6 está alterada nas doenças neuroinflamatórias, como a DA, com expressão aumentada no entorno das placas amilóides e no fluido cerebrospinal. Em culturas de células gliais, a IL-6 estimula a síntese da APP, e em culturas de neurônios corticais aumenta o dano induzido por β -amilóide (ERTA et al., 2012). Jin e colaboradores (2005) e Zhang e colaboradores (2013b) demonstraram o aumento da citocina em modelo

murino transgênico de DA. Segundo Erta e colaboradores, apesar dos resultados citados anteriormente, estudos demonstram um papel benéfico de IL-6 na patologia, em princípio, devido à gliose, que atenua a deposição de β -amilóide e aumenta a fagocitose microglial. Entretanto, no presente estudo não foi visualizado o aumento de IL-6 nos animais submetidos ao modelo de DA. Novamente, esse resultado discordante com a literatura pode ser devido ao tempo entre a indução do modelo e a dosagem da citocina. Já o inibidor dual de PI3K/ mTOR foi capaz de aumentar a IL-6 no hipocampo ipsilateral dos animais ($p=0,0793$), por mecanismo ainda desconhecido. Balschun e colaboradores (2004) demonstraram que o aumento fisiológico de IL-6 regula negativamente a LTP e a consolidação da memória. Esses autores ainda sugerem que a citocina pode atuar limitando e selecionando o armazenamento de informações. Dessa forma, não é possível concluir as consequências exatas do aumento da IL-6 após o tratamento com o NVP-BEZ 235.

Conforme descrito anteriormente, o papel de TNF- α e IL-6, é controverso na DA. Não é possível afirmar, portanto, se o aumento de TNF- α e IL-6 promovido por NVP-BEZ235 desempenha papel prejudicial ou protetor. Todavia, ao associar essa análise à melhoria cognitiva e à diminuição da morte e aumento da viabilidade celular, é possível especular que essa alteração em níveis de citocinas não induz prejuízo da memória no modelo utilizado.

A IL-10 atua interagindo com receptores de superfície, presentes principalmente em células da glia (RUBIO-PEREZ, MORILLAS-RUIZ, 2008). Jin e colaboradores (2008) demonstraram aumento desta citocina em modelo murino transgênico de DA. Vários autores demonstraram que os efeitos comportamentais de IL-10 são consequência de um efeito inibitório na produção de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ e TNF- α , e não um efeito direto dessa molécula (MESQUITA et al., 2008;

KIYOTA et al., 2010). IL-10 possui, portanto, potencial para melhorar a neuroinflamação, a disfunção cognitiva e a neurodegeneração na DA (KIYOTA et al., 2010). Foi demonstrado por Mesquita e colaboradores (2008) que tanto superexpressão quanto deleção de IL-10 não alteram nem a memória espacial de camundongos no MWM nem a expressão das citocinas IFN- γ e TNF- α . Por outro lado, Kiyota e colaboradores (2010) demonstraram a IL-10 é capaz de melhorar o aprendizado espacial em modelo transgênico de DA. No presente trabalho foi observada uma pequena redução dos níveis dessa citocina em animais infundidos com A β ₁₋₄₂, e uma reversão deste efeito no grupo tratado com NVP-BEZ235. Esse aumento pode, dessa forma, estar associado à melhora no desempenho cognitivo desse grupo de animais.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, demonstramos que um inibidor dual de PI3K/ mTOR melhora o desempenho de animais que receberam administração intrahipocampal de β -amilóide 1-42 na tarefa de reconhecimento de objetos, além de induzir efeitos neuroprotetores. Estes efeitos poderiam estar relacionados com a alteração da produção de diferentes citocinas, tais como IL-6, TNF α e IL-10.

REFERÊNCIAS

ALLEN, S. J.; WATSON, J. J.; DAWBARN, D. The Neurotrophins and Their Role in Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 9, n. 4, p. 559-573, 2011.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Science and Progress. Disponível em: <<http://www.alz.org/research/overview.asp>>. Acesso em 07 jan. 2014.

AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G. M.; COOPER, N. R.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, B. L.; FINCH, C. E.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W.S.T.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LUE, L.-F.; MRAK, R.; MACKENZIE, I. R.; MCGEER, P. L.; O'BANION, M. K.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, J.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; MUISWINKEL F. L. V.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G.; WYSS-CORAY, T. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 3, p. 383-421, 2000.

ARIF, M.; CHIKUMA, T.; AHMED, M.; NAKAZATO, M.; SMITH, M. A.; KATO, T. Effects of memantine on soluble $\text{a}\beta_{25-35}$ -induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's Disease model rat brain regions. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 1199-1209, 2009.

BALSCHUN, D.; WETZEL, W.; DEL REY, AL.; PITOSSE, F.; SCHNEIDER, H.; ZUSCHRATTER, W.; BESEDOVSKY, H. O. Interleukin-6: a cytokine to forget. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 14, 2004.

BARON, R.; NEMIROVSKY, A.; HARPAZ, I.; COHEN, H.; OWENS, T.; MONSONEGO, A. IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. **FASEB Journal**, v. 22, n. 8, p. 2843-2852, 2008.

BELARBI, K.; ROSI, S. Modulation of adult-born neurons in inflamed hippocampus. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, 2013.

BERNAL-MONDRAGÓN, C.; RIVAS-ARANCIBIA, S.; KENDRICK, K. M.; GUEVARA-GUZMÁN, R. Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A- β 25–35 injection in hippocampus. **BMC Neuroscience**, v. 14, 2013.

BD. BD Cytometric Bead Array: Multiplexed Bead-Based Immunoassays. Disponível em: <http://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_Brochure_Intl.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2014.

BHASKAR, K.; MILLER, M.; CHLUDZINSKI, A.; HERRUP, K.; ZAGORSKI, M.; LAMB, B. T. The PI3K-Akt-mTOR pathway regulates A β oligomer induced neuronal cell cycle events. **Molecular Neurodegeneration**, v. 4, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENNAN, F. X.; BECK, K. D.; SERVATIUS, R. J. Low doses of interleukin-1b improve the leverpress avoidance performance of Sprague–Dawley rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 2, p. 168–171, 2003.

BRENNAN, F. X.; TIEDER III, J. B. Centrally administered tumor necrosis factor- α facilitates the avoidance performance of Sprague–Dawley rats. **Brain Research**, v. 1109, n. 1, p. 142-146, 2006.

CANAS, P. M.; PORCIÚNCULA, L. O.; CUNHA, G. M. A.; SILVA, C. G.; MACHADO, N. J.; OLIVEIRA, J. M. A.; OLIVEIRA, C. R.; CUNHA, R. A. Adenosine A_{2A} Receptor Blockade Prevents Synaptotoxicity and Memory Dysfunction Caused by amyloid- β Peptides via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 47, p. 14741–14751, 2009.

CAO, C.; ARENDASH, G. W.; DICKSON, A.; MAMCARZ, M. B.; LIN, X.; ETHELL, D. W. A β -specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. **Neurobiology of Disease**, v. 34, n. 1, p. 63-70, 2009a.

CAO, P.; MAIRA, S.-M.; GARCÍA-ECHEVERRÍA, C.; HEDLEY, D. W. Activity of a novel, dual PI3-kinase/mTor inhibitor NVP-BEZ235 against primary human pancreatic cancers grown as orthotopic xenografts. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 8, 1267-1276, 2009b.

CASTELLO, N. A.; GREEN, K. N.; LAFERLA, F. M. Genetic Knockdown of Brain-Derived Neurotrophic Factor in 3xTg-AD Mice Does Not Alter A β or Tau Pathology. **PLoS One**, v.7, n. 8, 2012.

CHAKRABARTY, P.; TIANBAI, L.; HERRING, A.; CEBALLOS-DIAZ, C.; DAS, P.; GOLDE, T. E. Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. **Molecular Neurodegeneration**, v.7, 2012.

CHEN, L.; WANG, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; HE, D.; SOKABE, M.; CHEN, L. DMXB (GTS-21) Ameliorates the Cognitive Deficits in Beta Amyloid_{25–35} - Injected Mice Through Preventing the Dysfunction of Alpha₇ Nicotinic Receptor. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 8, p. 1784–1794, 2010.

CLINALTRIALS.GOV. Search for Studies. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov>>. Acesso em 14 fev. 2014.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

COSTA-MATTIOLI, M.; MONTEGGIA, L. M. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 1537-1543, 2013.

DANUELLO, A.; ROMEIRO, N. C.; GIESEL, G. M.; PIVATTO, M.; VIEGAS JR., C.; VERLI, H.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; CASTRO, N. G.; BOLZANI, V. S. Molecular Docking and Molecular Dynamic Studies of Semi-Synthetic Piperidine Alkaloids as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 163-170, 2012.

DE OLIVEIRA, A. C. P.; CANDELARIO-JALIL, E.; LANGBEIN, J.; WENDEBURG, L.; BHATIA, H. S.; SCHLACHETZKI, J. M. C.; BIBER, K.; FIEBICH, B. L. Pharmacological inhibition of Akt and downstream pathways modulates the expression of COX-2 and mPGES-1 in activated microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, 2012.

DÓRIA, J. G. **Efeito neuroprotetor dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5 na Doença de Huntington**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Programa de Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

DORIA, J. G.; SILVA, F. R.; SOUZA, J. M.; VIEIRA, L. B.; CARVALHO, T. G.; REIS, H. J.; PEREIRA, G. S.; DOBRANSKY, T.; RIBEIRO, F. M. Metabotropic Glutamate Receptor 5 Positive Allosteric Modulators are Neuroprotective in a Mouse Model of Huntington-s Disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 909-921, 2013.

ERTA, M.; QUINTANA, A.; HIDALGO, J. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 9, p. 1254-1266, 2012.

FURUKAWA-HIBI, Y.; ALKAM, T.; NITTA, A.; MATSUYAMA, A.; MIZOGUCHI, H.; SUZUKI, K.; MOUSSAOUI, S.; YU, Q.-S.; GREIG, N. H.; NAGAI, T.; YAMADA, K. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 222-229, 2011.

GALANY, R.; WEISS, I.; CASSEL, J.-C.; KELCHE, C. Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. **Behavioural Brain Research**, v. 96, n. 1-2, p. 1-12, 1998.

GIOVANNINI, M. G.; SCALI, C.; PROSPERI, C.; BELLUCCI, A.; VANNUCCHI, M. G.; ROSI, S.; PEPEU, G.; CASAMENTI, F. amyloid- β -Induced Inflammation and Cholinergic Hypofunction in the Rat Brain in Vivo: Involvement of the p38MAPK Pathway. **Neurobiology of Disease**, v. 11, n. 2, p. 257-274, 2002.

GÖTZ, J.; ITTNER, L. M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Nature Reviews**, v. 9, n. 7, p. 532-544, 2008.

GREENFIELD, S. Discovering and targeting the basic mechanism of neurodegeneration: The role of peptides from the C-terminus of acetylcholinesterase Non-hydrolytic effects of ache: The actions of peptides derived from the C-terminal and their relevance to neurodegeneration. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 3, p. 543–546, 2013.

GRIMM, M. O. W.; METT, J.; STAHLMANN, C. P.; HAUPENTHAL, V. J.; ZIMMER, V. C.; HARTMANN, T. Neprilysin and A β clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2013.

HAGG, T. Molecular Regulation of adult CNS neurogenesis: as integrated view. **Trends in Neuroscience**, v. 28, n. 11, p. 589-595, 2005.

HAIJ, M. E.; KESSELS, R. P. C. Context Memory in Alzheimer's Disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 3, n. 1, p. 342-350, 2013

HAZRA, A.; GU, F.; AULAKH, A.; BERRIDGE, C.; ERIKSEN, J. L.; ZIBURKUS, J. Inhibitory Neuron and Hippocampal Circuit in an Aged Mouse Model of Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

HICKMAN, S. E., ALLISON, E.K., KHOURY, J.E. Microglial dysfunction and defective amyloid- β clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 33, p. 8354-8360, 2008.

HUANG, J.; MANNING, B. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, p. 217-222, 2009.

HUANG, X.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; MA, Q.; ZHANG, Y.; XU, H. Salubrinal attenuates amyloid- β -induced neuronal death and microglial activation by inhibition of de NF- κ B pathway. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 5, 2012.

HURLEY, L. L.; TIZABI, Y. Neuroinflammation, Neurodegeneration and Depression. **Neurotoxicity Research**, v.23, n. 2, p. 131-144, 2013.

ITO, K. Frontiers of Model Animals for Neuroscience: Two Prosperous Aging Model Animals for Promoting Neuroscience Research. **Experimental Animals**, v. 62, n. 4, p. 275-280, 2013

JIANG, S.; LI, Y.; ZHANG, X.; BU, G.; XU, H.; ZHANG, Y.-W. Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 9, n. 1, 2014.

JIN, J. J.; KIM, H. D.; MAXWELL, J. A.; LI, L.; FUKUCHI, K. Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 23, 2008.

JIN, Y.; YAN, E.-Z.; FAN, Y.; ZONG, Z.-H.; QI, Z.-M.; LI, Z. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 8, p. 943–951, 2005.

KETTENMAN, H.; HANISCH, U.-K.; VERKHRATSKY, A. Physiology of Microglia. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 461-533, 2011.

KITAGISHI, Y. KOBAYASHO, M.; KIKUTA, K.;MATSUDA, S. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. **Depression Research and Treatment**, 2012.

KYIOTA, T.; OKUYAMA, S.; SWAN, R. J.; JACOBSEN, M. T.; GENDELMAN, H. E.; IKEZU, T. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 8, p. 3093–3102, 2010.

KYIOTA, T.; INGRAHAM, K. L.; SWAN, R. J.; JACOBSEN, M. T.; ANDREWS, S. T.; IKEZU, T. AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. **Gene Therapy**, v. 19, n. 7, p. 724-733, 2013.

LIFE TECHNOLOGIES. LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*, 2005. Disponível em: <<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>>. Acesso em: 15 jan 2014.

LORENZO, A.; YANKNER, B. A. amyloid- β neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 25, p. 12243-12247, 1994.

LYONS, A.; MURPHY, K. J.; CLARKE, R.; LYNCH, M. A. Atorvastatin prevents age-related and amyloid- β -induced microglial activation by blocking interferon- γ release from natural killer cells in the brain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, 2011.

MAIESE, K.; CHONG, Z. Z.; SHANG, Y. C.; WANG, S. Targeting disease through novel pathways of apoptosis and autophagy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. 12, p. 1203–1214, 2012.

MAIRA, S. M.; STAUFFER, F.; BRUEGGEN, J.; FURET, P.; SCHNELL, C.; FRITSCH, C.; BRACHMANN, S.; CHÈNE, P.; DE POVER, A.; SCHOEMAKER, K.; FABBRO, D.; GABRIEL, D.; SIMONEN, M.; MURPHY, L.; FINAN, P.; SELLERS, W.; GARCÍA-ECHEVERRÍA, C. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.7, n. 7, p. 1851-1863, 2008.

MARTINEZ-CORIA, H.; GREEN, K. N.; BILLINGS, L. M.; KITAZAWA, M.; ALBRECHT, M.; RAMMES, G.; PARSONS, C. G.; GUPTA, S.; BANERJEE, P.; LAFERLA, F. M. Memantine Improves Cognition and Reduces Alzheimer's-Like Neuropathology in Transgenic Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 2, p. 870-880, 2010.

MASUDA, M.; SHIMOMURA, M.; KOBAYASHI, K.; KOJIMA, S.; NAKATSURA, T. Growth inhibition by NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in hepatocellular carcinoma cell lines. **Oncology Reports**, v. 26, n. 5, p. 1273-1279, 2011.

MCALPINE, F. E.; LEE, J.-K.; HARMS, A. S.; RUHN, K. A.; BLURTON-JONES, M.; HONG, J.; DAS, P.; GOLDE, T. E.; LAFERLA, F. M.; ODDO, S.; BLESCH, A.; TANSEY, M. G. Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. **Neurobiology of Disease**, v. 34, n. 1, p. 163–177, 2009.

MESQUITA, A. R.; CORREIA-NEVES, M.; ROQUE, S.; CASTRO, A. G.; VIEIRA, P.; PEDROSA, J.; PALHA, J. A.; SOUSA, N. IL-10 modulates depressive-like behavior. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, n. 2, p. 89-97, 2008.

MEUNIER, J.; IENI, J.; MAURICE, T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid β 25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the δ 1 receptor. **British Journal of Pharmacology**, v.149, n. 8, p. 998–1012, 2006.

MOKHTAR, S. H.; BAKHURAYSAH, M. M.; CRAM, D. S.; PETRATO, S. The Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease: Communication Breakdown by Modifying the Neuronal Cytoskeleton. **International Journal of Alzheimer's Disease**, 2013

MONTGOMERY, S. L.; MASTRANGELO, M. A.; HABIB, D.; NARROW, W. C.; KNOWLDEN, S. A.; WRIGHT, T. W.; BOWERS, W. J. Ablation of TNF-R1/RII Expression in Alzheimer's Disease Mice Leads to an Unexpected Enhancement of Pathology. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 4, p. 2053–2070, 2011.

MOON, M.; CHOI, J. G.; NAM, D. W.; HONG, H.-S.; CHOI, Y.-J.; OH, M. S.; MOOK-JUNG, I. Ghrelin Ameliorates Cognitive Dysfunction and Neurodegeneration in Intrahippocampal Amyloid- β 1-42 Oligomer-Injected Mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 23, n.1, p. 147–159, 2011.

MUKHERJEE, B.; TOMIMATSU, N.; AMANCHERLA, K.; CAMACHO, C. V.; PICHAMOORTHY, N.; BURMA, S. The Dual PI3K/ mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 is a Potent Inhibitor of ATM- and DNA-PKCs Mediated DNA Damage Responses. **Neoplasia**, v. 14, n. 1, p. 34-43, 2012.

MURAI, T.; OKUDA, S.; TANAKA, T.; OHTA, H. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiology & Behavior**, v. 90, n. 1, p. 116-124, 2007.

NAERT, G.; RIVEST, S. Age-related changes in synaptic markers and monocyte subsets link the cognitive decline of APP_{Swe}/PS1 mice. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, 2012.

NAUDE, P. J. W.; DOBOS, N.; VAN DER MEER, D.; MULDER, C.; PAWIRONADI, K. G. D.; DEN BOER, J. A.; VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M.; EISEL, U. L. M. Analysis of cognition, motor performance and anxiety in young and aged tumor necrosis factor alpha receptor 1 and 2 deficient mice. **Behavioural Brain Research**, v. 258, p. 43–51, 2014.

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

ODDO, S. CACCAMO, A.; TRAN, L.; LAMBERT, M. P.; GLABE, C. G.; KLEIN, W. L.; LAFERLA, F. M. Temporal Profile of Amyloid- β (A β) Oligomerization in an *in Vivo* Model of Alzheimer Disease: A Link Between β and Tau Pathology. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1599-1604, 2006.

OLÁH, Z.; PÁKÁSKI, M.; JANKA, Z.; KÁLMÁN, J. Marking the Markers of Alzheimer's: Too good to diagnose, too bad to use? **Neuropsychopharmacologia huNgarica**, v. 14, n. 3, p. 165-176, 2012

PASSOS, G. F.; FIGUEIREDO, C. P.; PREDIGER, R. D. S.; SILVA, K. A. B. S.; SIQUEIRA, J. M.; DUARTE, F. S.; LEAL, P. C.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J. B. Involvement of phosphoinositide 3-kinase γ in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by amyloid- β 1–40 peptide in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 3, p. 493-501, 2010

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. [Estados Unidos da América]: Academic Press, 2001. 1 CD.

PREDIGER, R. D. S.; FRANCO, J. L.; PANDOLFO, P.; MEDEIRO, R.; DUARTE, F. S.; GIUNTA, G. D.; FIGUEIREDO, C. P.; FARINA, M.; CALIXTO, J. B.; TAKAHASHI, R. N.; DAFRE, A. L. Differential susceptibility following amyloid- β peptide-(1–40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behavioral Brain Research**, v.177, n. 2, p. 205-213, 2007.

QU, Y.; VAN DER GUCHT, E.; MASSIE, A.; VANDENBUSSCHE, E.; VANDESANDE, F.; ARCKENS, L. In vivo microdialysis in the visual cortex of awake cat III: Histological verification. **Brain Research Protocols**, v. 7, n. 1, p. 52-60, 2001.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 329-344, 2010.

R&D SYSTEMS. **ELISA Development Guide**: a guide for the use of antibodies in ELISA development. Disponível em: <<http://www.rndsystems.com/resources/images/5670.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2014.

ROBERSON, E. D.; MUCKE, L. 100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease. **Science**, v. 314, n. 5800, p. 781-784, 2006.

ROBINSON, A.; GRÖSGEN, S.; METT, J.; ZIMMER, V. C.; HAUPENTHAL, V. J.; HUNSDÖRFER, B.; STAHLMANN, C. P.; SLOBODSKOY, Y.; MÜLLER, U. C.; HARTMANN, T.; STEIN, R.; GRIMM, M.O. Upregulation of PGC-1 α expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. **Aging Cell**, 2013.

ROMBERG, C. MCTIGHE, S. M.; HEATH, C. J.; WHITCOMB, D. J.; CHO, K.; BUSSEY, T. J.; SAKSIDA, L. M. False recognition in a mouse model of Alzheimer's disease: rescue with sensory restriction and memantine. **Brain**, v.135, n. 7, p. 2103–2114, 2012.

ROSS, F. M.; ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J.; VERKHRATSKY, A. A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. **Journal of Neuroimmunology**, v. 144, n. 1-2, p. 61-67, 2003.

RUBIO-PEREZ, J. M.; MORILLAS-RUIZ, J. M. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. **The Scientific World Journal**, v. 30, n. 2012.

RUIVO, L. M. T.-G.; MELLOR, J. R. Cholinergic modulation of hippocampal network function. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, 2013.

SALKOVIC-PETRISIC, M. KNEZOVIC, A.; HOYER, S.; RIEDERER, P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 1, p. 233-252, 2013.

SANPHUI, P.; BISWAS, S. C. FoxO3a is activated and executes neuron death via Bim in response to amyloid- β . **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 5, 2013.

SCHINDOWSKI, K.; BELARBI, K.; BUÉE, L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. **Genes, Brain and Behavior**, v. 7, sup 1., p. 43-56, 2008.

SCHUMUED, L. C.; STOWERS, C. C.; SCALLET, A. C.; XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Research**, v. 1035, n. 1, p. 24-31, 2005.

SCLIP, A.; TOZZI, A.; ABAZA, A.; CARDINETTI, D.; COLOMBO, I.; CALABRESI, P.; SALMONA, M.; WELKER, E.; BORSELLO, T. c-Jun N-terminal kinase has a key role in Alzheimer disease synaptic dysfunction in vivo. **Cell Death and Disease**, 2014.

SERRA, V.; MARKMAN, B.; SCALTRITI, M.; EICHHORN, P. J. A.; VALERO, V.; GUZMAN, M.; BOTERO, M. L.; LIONCH, E.; ATZORI, F.; DI COSIMO, S.; MAIRA, M.; GARCIA-ECHEVERRIA, C.; PARRA, J. L.; ARRIBAS, J.; BASELGA, J. NVP-BEZ235, a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Prevents PI3K Signaling and Inhibits the Growth of Cancer Cells with Activating PI3K Mutations. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, p. 8022-8030, 2008.

SHIMIZU, E.; KAWAHARA, K.; KAJIZONO, M.; SAWADA, M.; NAKAYAMA, H. IL-4-Induced Selective Clearance of Oligomeric amyloid- β Peptide 1–42 by Rat Primary Type 2 Microglia. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6503-6513, 2008.

SUENAGA, Y.; ISLAM, S. M. R.; ALAGU, J.; KANEKO, Y.; KATO, M.; TANAKA, Y.; KAWANA, H.; HOSSAIN, S.; MATSUMOTO, D.; YAMAMOTO, M.; SHOJI, W.; ITAMI, M.; SHIBATA, T.; NAKAMURA, Y.; OHIRA, M.; HARAGUCHI, S.; TAKATORI, A.; NAKAGAWARA, A. *NCYM*, a *Cis*-Antisense Gene of *MYCN*, Encodes a *De Novo* Evolved Protein That Inhibits GSK3 β Resulting in the Stabilization of *MYCN* in Human Neuroblastomas. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 1, 2014.

SUN, X.; JIM, L.; LING, P. Review of drugs for Alzheimer's disease. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 6, n. 6, p. 285-290, 2012.

TELL, V.; HILGEROTH, A. Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, 2013.

TOBINICK, E.; GROSS, H.; WEINBERGER, A.; COHEN, H. TNF-alpha Modulation for Treatment of Alzheimer's Disease: A 6-Month Pilot Study. **Medscape General Medicine**, v. 8, n. 2, 2006.

TRAN, M. H.; YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Amyloid b-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview. **Peptides**, v. 23, n. 7, p.1271-1283, 2012.

TWEEDIE, D.; FERGUSON, R. A.; FISHMAN, K.; FRANKOLA, K. A.; PRAAG, H.V.; HOLLOWAY, H. W.; LUO, W.; LI, Y.; CARACCILO, L.; RUSSO, I.; BASLATI, S.; RAY, B.; LAHIRI, D. K.; BOSETTI, F.; GREIG, N. H.; ROSI, S. Tumor necrosis factor- α synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, 2012.

WANG, L.; XI, G.; KEEP, R. F.; HUA, Y. Iron enhances the neurotoxicity of amyloid β . **Translational Stroke Research**, v. 3, n. 1, p. 107-113, 2012

WIRTH, M.; MADISON, C. M.; RABINOVICI, G. D.; OH, H.; LANDAU, S. M.; JAGUST, W. J.; ALZHEIMER'S DISEASE NEUROIMAGING INITIATIVE. Alzheimer's disease neurodegenerative biomarkers are associated with decreased cognitive function but not beta-amyloid in cognitively normal older individuals. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 13, p. 5553-5563, 2013.

WYSS-CORAY, T.; MUCKE, L. Inflammation in Neurodegenerative Disease - A Double-Edged Sword. **Neuron**, v. 35, n. 3, p.419-432, 2002.

XUAN, A.; LONG, D.; LI, J; JI, W.; ZHANG, M.; HONG, L.; LIU, J. Hydrogen sulfide attenuates spatial memory impairment and hippocampal neuroinflammation in beta-amyloid rat model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, 2012.

YAMAMOTO, M.; KIYOTA, T.; HORIBA, M.; BUESCHER, J. L.; WALSH, S. M.; GENDELMAN, H. E.; IKEZU, T. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Regulate Amyloid- β Plaque Deposition and β -Secretase Expression in Swedish Mutant APP Transgenic Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 680-692, 2007.

YANG, F.; QIAN, X.-J.; QIN, W.; DENG, R.; WU, X.-Q.; QIN, J.; FENG, G.-K.; ZHU, X.-F. Dual Phosphoinositide 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor NVP-BEZ235 Has a Therapeutic Potential and Sensitizes Cisplatin in Nasopharyngeal Carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

YE, J.; ZHANG, Y. Curcumin protects against intracellular amyloid toxicity in rat primary neurons. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 5, n. 1, p. 44-49, 2012.

ZAMANI, Z.; REISI, P.; ALAEI, H.; PILEHVARIAN, A. A. Effect of Royal Jelly on spatial learning and memory in rat model of streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease. **Advanced Biomedical Research**, v. 1, n. 2, 2012.

ZHANG, D.; HU, X.; QIAN, L.; CHEN, S.-H.; ZHOU, H.; WILSON, B.; MILLER, D. S.; HONG, J.-S. Microglial MAC1 receptor and PI3K are essential in mediating b-amyloid peptide-induced microglial activation and subsequent neurotoxicity. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 3, 2011.

ZHANG, J.; KE, K. F.; LIU, Z.; QIU, Y. H.; PENG, Y. P. Th17 Cell-Mediated Neuroinflammation Is Involved in Neurodegeneration of Ab1-42-Induced Alzheimer's Disease Model Rats. **PLoS One**, v.8, n. 10, 2013a.

ZHANG, Y.-Y.; FAN, Y.-C.; WANG, M.; WANG, D.; LI, X.-H. Atorvastatin attenuates the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β 1-42-induced rat model of Alzheimer's disease. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 103-110, 2013b.

ZIMMERMANN, J.; KRAUTHAUSEN, M.; HOFER, M. J.; HENEKA, M. T.; CAMPBELL, I. L.; MÜLLER, M. CNS-Targeted Production of IL-17A Induces Glial Activation, Microvascular Pathology and Enhances the Neuroinflammatory Response to Systemic Endotoxemia. **PLoS One**, v. 8, n. 2, 2013.