

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Camila Anastacia Monteiro Ferraz Augusto

Butirato de sódio como um potencial agente neuroprotetor em modelo experimental
da doença de Alzheimer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Dr. Rudimar Luiz Frozza
Dra. Andressa Bernardi

RIO DE JANEIRO

2017

Augusto, Camila Anastacia Monteiro Ferraz.

Butirato de sódio como um potencial agente neuroprotetor em modelo experimental da doença de Alzheimer / Camila Anastacia Monteiro Ferraz Augusto. - Rio de Janeiro, 2017.

73 f.; il.

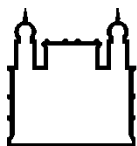
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Rudimar Luiz Frozza.

Co-orientadora: Andressa Bernardi.

Bibliografia: f. 48-61

1. Doença de Alzheimer. 2. Neuroinflamação . 3. Butirato de sódio. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Camila Anastacia Monteiro Ferraz Augusto

Butirato de sódio como um potencial agente neuroprotetor em modelo experimental
da doença de Alzheimer

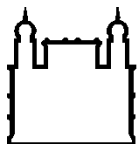
ORIENTADORES: Dr. Rudimar Luiz Frozza
Dra. Andressa Bernardi

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Adriana Ribeiro Silva - Presidente
Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque
Prof. Dr. Julia Helena Rosauro Clarke

Rio de Janeiro, 23 de agosto de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Pai pela companhia, parceria e amor sobrenatural.

Aos meus pais Carlos e Madalena por serem presentes de Deus em minha vida, exemplos de caráter e melhores amigos.

Aos meus irmãos Kiko, Mickey e Minnie pelo amor incondicional.

À minha avó Carmen Augusto, minhas tias Edna Ferraz, Eliete Ferraz, Marineia Ferraz e Fernanda Uchoa, meus tios Luís Augusto, Guilherme Ferraz e Sílvio Ribeiro, meus primos Yago Henrique, Rafael Ferraz, Leandro Fernandes, Leonardo Rios, Eduardo Godoi e Breno Garone, minhas primas Tatiana Ferraz e Fernanda Ribeiro meus padrinhos Beatriz e Tadeu, meu afilhado Rafael Rios e minha eterna babá Estela por compreenderem minha ausência quando o estudo necessitou de grande atenção e por todo amor que me dedicam.

Aos meus orientadores Rudimar Frozza e Andressa Bernardi por toda orientação prática e teórica, pelas discussões científicas e dedicação a este trabalho.

Ao companheiro de grupo Octávio Victor pela parceria para realização desse trabalho.

Aos membros do Laboratório de Pesquisa sobre o Timo pela amizade e companheirismo, em especial aos amigos Andres Mojoli, Luciana Peixoto, Bruna Martins, Pedro Ferreira, Brenno Barros, Rhaissa Vieira, Triciana Silva, Raquel Martins, Yasmin Abraham e Marina Agostinho pelo carinho diário.

Aos membros do grupo de pesquisa em doenças neurodegenerativas da UFRJ pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho, em especial à Dr. Júlia Clarke.

Aos velhos amigos Jéssica Nogueira, Aline Marques, Gabriel Javoski, Lorena Moura, Juliana Fonseca, Fellipe Monaco, Mari Mattos, Bia Barbosa e Paulo César que me ensinam o poder e o valor de uma amizade verdadeira.

Ao melhor amigo Rafael Pais por ser prova viva do amor de Deus por mim.

Às minhas irmãs de coração Aninha Guedes e Juliana Carrilho por serem refúgio nos momentos de tempestade.

Às “Mädchen” Larissa Repinaldo, Larissa Coelho e Júlia Abal que alegam minhas aulas de alemão.

Às minhas “amigas adultas” Valeria Carrilho, Valeria Cristina e Tania Melo pelo carinho.

Às amigas Fernanda Sobral e Jamile Mota pelo companheirismo incomparável.

Aos companheiros de jornada acadêmica Juliana Amicucci e Sergio Ribeiro que seguiram por outros caminhos, mas no coração permaneceram.

Aos amigos do ICTQ Cíntia Carboni, Renan Alvez, Simone Carvalho, Corina Waldyr, Diogo Parreira e Andréia Miranda pela amizade, cumplicidade e companhia de estudo.

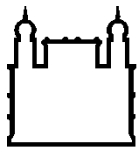
Aos muitos professores inspiradores que passaram pela minha vida, aqui representados por Mariza Guimarães, Monique Sourisseau, Hélio Caminha, Luís Cláudio Valentin, Ana Batista, Luiz Augusto Sobreiro e Roberta Messias.

Ao Dr. Adriano Almeida e aos farmacêuticos tutores de estágio Gustavo, Rosana, Luana, Gil e Marcelo, também os auxiliares Maria Alice, Fabiana, Josi e Bel, por todo ensinamento compartilhado.

Ao amigo e eterno orientador Fábio Cerdeira pela amizade e influência acadêmica de grande valia.

Aos meus professores do curso de farmácia Ethel Valdez, Bárbara Lorca, Fabiano de Jesus, Paulo Maurício, Letice Almeida, Lourdes Martins, Anicet Okinga, Tereza Leitão e Leandro Motta pela paciência, parceria inigualável e amizade.

O meu sincero agradecimento, carinho e respeito às equipes que colaboram direta e indiretamente para o funcionamento da Fiocruz, especialmente do Laboratório de Pesquisa sobre o Timo, aqui representados por Elaine Apolinário, Valmir Quintela, Verônica Nascimento e Sheila Diniz.

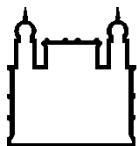


Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

“E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito”. Romanos 8:28.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Butirato de sódio como um potencial agente neuroprotetor em modelo experimental da doença de Alzheimer.

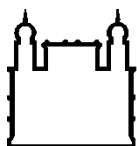
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Anastacia Monteiro Ferraz Augusto

O aumento da expectativa de vida acarreta em um aumento no número de indivíduos que alcançam idades em que as doenças crônicas-degenerativas tornam-se prevalentes. Dentre elas destaca-se a doença de Alzheimer (DA), caracterizada principalmente pela perda de memória, ativação glial e de diversas vias de sinalização celular resultando em uma intensa resposta neuroinflamatória. Por se tratar de uma doença multifatorial, não existe terapia capaz de frear sua progressão. Nesse contexto o butirato de sódio (NaB), um inibidor da enzima histona desacetilase (HDAC) que possui atividade anti-inflamatória, surge como um potencial agente terapêutico contra a DA. Esta dissertação teve como estratégia geral avaliar o potencial efeito neuroprotetor do NaB em modelo experimental da doença de Alzheimer. Empregando-se cultura organotípica de hipocampo de ratos que foram expostas a oligômeros do peptídeo A β (A β Os) e tratadas com NaB foi realizado o ensaio da incorporação de iodeto de propídeo (IP) e avaliação da acetilação de histonas por *Western blotting*. As concentrações de NaB utilizadas não desencadearam toxicidade nas culturas. O tratamento com NaB aumentou de forma significativa a acetilação das histonas H2B e H3. Para avaliar o efeito do NaB sobre alterações comportamentais e neuroinflamatórias, camundongos receberam uma injeção intracerebroventricular (ICV) de A β Os e foram tratados com 300 ou 750 mg/Kg de NaB, via intraperitoneal, por 8 dias. Os animais foram submetidos ao teste comportamental de reconhecimento de objetos (RO) para avaliar alterações na memória de curta duração. Para avaliar alterações na memória de longa duração foi utilizado o teste de medo condicionado ao contexto. Em ambos os testes os animais injetados com A β Os apresentaram danos na memória e o tratamento com NaB foi capaz de reduzir estas alterações. Os níveis de TNF- α e IL-6 foram quantificados por ELISA no córtex pré-frontal e no soro desses animais, observando-se que o tratamento com NaB foi capaz de reverter o aumento nos níveis dessas citocinas induzido pelos A β Os. A ativação de JNK, p38 e ERK foi avaliada no hipocampo por *Western blotting*. Os grupos injetados com A β Os apresentaram um aumento significativo na fosforilação/ativação dessas vias, enquanto o tratamento com NaB impediu esse efeito. O imunoconteúdo de GFAP foi avaliado por *Western blotting*. A injeção com A β Os promoveu um aumento significativo no imunoconteúdo desse marcador, enquanto que o tratamento com NaB impediu esse efeito. Nossos resultados sugerem que o NaB apresenta um potencial efeito neuroprotetor frente à toxicidade induzida por A β Os.

Palavras chave: Doença de Alzheimer, neuroinflamação e butirato de sódio.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Sodium butyrate as a potential neuroprotective agent in an experimental model of Alzheimer's disease.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Anastacia Monteiro Ferraz Augusto

The rise in life expectancy has resulted in an increased number of people achieving the age at which chronic and degenerative diseases become prevalent. Among these, Alzheimer's disease (AD) characterized mainly by memory loss and activation of glial cells and of several cell signaling pathways resulting in an intense neuroinflammatory response has emerged as the most prevalent form of neurodegenerative disorder. AD is a multifactorial disease and there is no effective therapy able to stop or reverse its progression. In this context, sodium butyrate (NaB), an inhibitor of histone deacetylase enzyme that has anti-inflammatory activity, rise as a potential therapeutic agent against AD. In this way, the present study was designed to evaluate the potential neuroprotective effect of NaB in an experimental model of AD. Organotypic hippocampal slice culture of rats was exposed to A β oligomers (A β O) and treated with NaB. To evaluate cell death, we performed propidium iodide (PI) incorporation assay 24 hours after A β O exposure and/or treatment with NaB. In order to investigate histone H2B and H3 acetylation, we performed *Western blotting*. The result showed that treatment with NaB did not trigger toxicity in the culture. It was observed that treatment with NaB significantly increased the acetylation of histones H2B and H3. Furthermore, to evaluate the effects of NaB against A β O-induced toxicity on cognitive dysfunction and neuroinflammation mice received an intracerebroventricular injection (ICV) of A β O and were treated with 300 or 750 mg/Kg of NaB intraperitoneally during 8 days. Novel object recognition test was performed to evaluate short-term memory. To evaluate long-term memory we performed contextual fear conditioning test. In both tests animals injected with A β O presented memory impairments and treatment with NaB was able to reduce these impairments. Levels of TNF- α and IL-6 were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay in the pre-frontal cortex and in the serum samples. The treatment with NaB was capable of blocking the increase in cytokine levels induced by A β O. Activation of JNK, p38 and ERK, as well as the GFAP immunocontent, were evaluated in the hippocampus by *Western blotting*. Groups injected with A β O showed a significant increase in the phosphorylation/activation of these proteins and treatment with NaB prevented this effect. In addition, injection of A β O promoted a significant increase in the immunocontent of GFAP, a classical marker of astrocyte activation, and the treatment with NaB prevented this effect. Our results suggest that NaB has a potential neuroprotective effect against A β O-induced toxicity.

Key words: Alzheimer's disease, neuroinflammation, and sodium butyrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Toxicidade induzida pela Tau hiperfosforilada.....	3
Figura 1.2: Processamento da APP pelas vias amiloidogênica e não amiloidogênica...4	
Figura 1.3: Estrutura química do butirato de sódio.....	13
Figura 4.1: Caracterização da preparação de A β Os.....	23
Figura 4.2: Imagens representativas da incorporação de IP.....	24
Figura 4.3: Análise quantitativa da morte celular.....	25
Figura 4.4: Efeito do tratamento com NaB sobre acetilação da histona H3.....	26
Figura 4.5: Efeito do tratamento com NaB sobre acetilação da histona H2b.....	27
Figura 4.6: Efeito do tratamento com NaB sobre a memória de curta duração no RO realizado 24 horas após a injeção de A β Os.....	29
Figura 4.7: Efeito do tratamento com NaB sobre a memória de curta duração no RO realizado 5 dias após a injeção de A β Os.....	31
Figura 4.8: Efeito do tratamento com NaB sobre a memória de longa duração.....	32
Figura 4.9: Efeito do tratamento com NaB sobre o perfil de citocinas pró-inflamatórias no córtex pré-frontal.....	34
Figura 4.10: Efeito do tratamento com NaB sobre o perfil da IL-10 no córtex pré-frontal.....	35
Figura 4.11: Efeito do tratamento com NaB sobre o perfil de citocinas pró-inflamatórias no soro.....	36
Figura 4.12: Efeito do tratamento com butirato de sódio sobre a via das MAPKs.....	38
Figura 4.13: Efeito do tratamento com butirato de sódio sobre o imunoconteúdo da GFAP.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença de Alzheimer.....	1
1.1.1. Aspectos gerais.....	1
1.1.2. Aspectos fisiopatológicos.....	2
1.1.3. Neuroinflamação e a doença de Alzheimer.....	6
1.1.4. Alterações epigenéticas.....	9
1.1.5. Diagnóstico e terapia.....	10
1.2. Butirato de sódio.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E METÓDOS.....	16
3.1. Animais.....	16
3.2. Preparo e caracterização de A β Os.....	16
3.3. Cultura organotípica de hipocampo e toxicidade induzida por A β Os.....	17
3.3.1. Incorporação do iodeto de propídeo.....	17
3.4. Injeção intracerebroventricular dos A β Os e tratamento dos animais com butirato de sódio.....	18
3.5. Reconhecimento de objeto (RO).....	19
3.6. Medo condicionado ao contexto.....	19
3.7. Coleta das amostras.....	20
3.8. Preparo das amostras e dosagem de proteína.....	20
3.9. <i>Western blotting</i>	21
3.10. ELISA.....	21
3.11. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Caracterização da preparação de A β Os.....	23
4.2. Efeito do butirato de sódio em cultura organotípica de hipocampo exposta aos A β Os.....	24
4.2.1. Análise da incorporação do iodeto de propídeo.....	24

4.2.2. Acetilação de histonas.....	25
4.3. Efeito do butirato de sódio sobre as alterações comportamentais induzidas pelos A β Os.....	27
4.3.1. Análise comportamental.....	27
4.3.2. Sinalização celular e neuroinflamação.....	33
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	48

ABREVIATURAS

- α 7nAChR - Receptor nicotínico da acetilcolina 7 α .
ApoE - Apolipoproteína E.
APP - Proteína precursora amiloide (Amyloid Precursor Protein).
APH-1 - Anterior Pharynx defective - 1.
A β - Peptídeo beta-amiloide.
A β Os - Oligômeros do peptídeo β -amiloide.
BACE-1 - Beta-secretase - 1 (Beta-Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme-1).
BBB - Barreira hematoencefálica (Blood Brain Barrier).
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (brain derived neurotrophic factor)
DA - Doença de Alzheimer.
DAMP - Padrões Moleculares Associados a Danos (Damage-Associated Molecular Patterns).
DNA – Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
ERK - Proteína cinase regulada por sinais extracelulares. (Extracellular Signal-Regulated Kinase).
FCSRT - Teste de Recordação Seletiva Livre e Guiada (The Free and Cued Selective Recall Reminding Test).
FAD – Doença de Alzheimer Familiar (Familial Alzheimer Disease)
GFAP - Proteína glial fibrilar ácida (Glial Fibrillary Acidic Protein).
GPCR – Receptor acoplado à proteína G (G-protein coupled Receptor)
GSK-3 β - Glicogênio sintase cinase 3 (Glycogen synthase kinase 3 beta)
iHDAC - inibidor da enzima histona desacetilase.
JNK - c-Jun N-terminal cinase (c-Jun N-terminal Kinase).
LOAD – Doença de Alzheimer de início tardio (Late-onset Alzheimer's Disease).
LRP - Receptor de lipoproteína de baixa densidade. (Low density Lipoprotein Receptor-related Protein).
LTP - Potenciação de longa duração (Long Term Potentialiation)
MAPs - Proteínas associadas aos microtúbulos. (Microtubule Associated Proteins).
MAPK - Proteínas cinases ativadas por mitógenos. (Mitogen-Activated Protein Kinase).
MCP1 - Proteína quimiotática de monócitos 1. (Monocyte Chemoattractant Protein-1).
MCT-1 - Transportadores de monocarboxilato 1. (Monocarboxylate Transporters).
MEEM - Mini-exame do estado mental.
MSK-1 - Proteína cinase 1 ativada por mitógeno ou estresse (Mitogen- and stress-activated protein kinase-1)
NGF - Fator de crescimento nervoso (Nerve growth factor)
NFTs - Emaranhados neurofibrilares. (Neurofibrillary Tangles).
NF κ B - Fator nuclear kappa B (Nuclear Factor kappa B).
NMDA - N-Metil-D-Aspartato.
P38 MAPK - Proteína cinase ativada por mitógenos.
PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos. (Pathogen Associated Molecular Patterns).
PEN-2 - Estimulador de presenilina 2 (Presenilin Enhancer 2).
PET-scan - Tomografia por emissão de pósitrons (Positron Emission Tomography)
PI3K - Fosfatidilinositol-3 cinase.
PS1 - Presenilina 1.

RAGE - Receptores para produtos finais de glicação avançada (*Receptor for Advanced Glycation End Products*).

RNA - Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*).

ROS - Espécies reativas de oxigênio. (*Reactive Oxygen Species*).

SCFA - Ácidos graxos de cadeia curta. (*Short Chain Fatty Acids*).

SMCT 1 - Transportadores de monocarboxilato acoplados ao sódio 1 (*sodium-coupled monocarboxylate transporters*)

SNC - Sistema nervoso central.

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta (*Transforming Growth Factor*)

TREM 2 - Receptor desencadeado expresso nas células mieloides 2. (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*).

TLRs - Receptores do tipo Toll (*Toll-like Receptors*).

Wnt - Família de proteínas glicosiladas ricas em cisteína derivadas do gene Wingless de *Drosophila* e do gene *Int-1* de camundongo. (Cysteine-rich glycosylated proteins named after the *Drosophila* Wingless and the mouse *Int-1* genes).

INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

1.1.1. Aspectos Gerais

Ao longo do século XX a expectativa de vida passou de aproximadamente 49 anos de idade para mais de 70 anos (1). Nos Estados Unidos estima-se que a população acima dos 65 anos de idade passe dos 40 milhões em 2010 para cerca de 70 milhões em 2030 (2). No Brasil o envelhecimento populacional segue a tendência mundial. De acordo com uma projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), em 2060 o país alcançará uma expectativa de vida de cerca de 81 anos (3). Este aumento da expectativa de vida tem levado a um aumento no número de indivíduos que alcançam idades em que as doenças crônicas e degenerativas tornam-se prevalentes tais como o câncer, as doenças cardiovasculares e a demência. Segundo Aprahamian *et al.* (2009), a partir dos 65 anos de idade a prevalência de demência dobra a cada cinco anos, passando de 0,7% entre 60 e 64 anos para 5,6% entre 70 e 79 anos e chegando a 38,6% aos 90 anos (4). Entre os tipos de demência, a doença de Alzheimer (DA) constitui 70% dos casos, atingindo mais de 35 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a terceira causa de morte nos países desenvolvidos (5–7). No aspecto econômico, segundo a projeção do relatório da “*Alzheimer’s Association*”, os custos anuais irão passar de 226 bilhões de dólares em 2015 para mais de 1 trilhão de dólares em 2050 (8). Considerando o processo de envelhecimento populacional e o aspecto econômico envolvido nos gastos com a DA, essa doença torna-se um grande desafio de saúde pública para as próximas décadas. A DA foi relatada pela primeira vez em 1906, no XXXVII Congresso Germânico de Psiquiatria em Tübingen, Alemanha, pelo médico Alois Alzheimer que apresentou o caso da paciente, Auguste D, a qual apresentava perda de memória e desorientação. Análises *post-mortem* do cérebro dessa paciente revelaram moderada hidrocefalia, atrofia cerebral, depósitos extracelulares de fibrilas e emaranhados proteicos intracelulares (9). Um século após a descoberta da doença seus principais sintomas já estão caracterizados, tais como a perda de memória, afasia (distúrbio na linguagem), apraxia (incapacidade de realizar movimentos coordenados) e agnosia (forma de amnésia perceptiva caracterizada pela incapacidade de reconhecer os objetos ou os símbolos usuais), como também distúrbios psiquiátricos tais quais depressão, delírios e alucinações, além de dificuldade de realizar atividades comuns

da vida diária (9,10). A maioria dos casos de DA são esporádicos (*Late-onset Alzheimer's disease* – LOAD) e correlacionam-se à idade, normalmente acometendo pessoas com mais de 65 anos. Considerando o caráter multifatorial da DA esporádica, tem sido proposto o envolvimento de componentes ambientais, comportamentais e hábitos alimentares (consumo de dietas com elevado teor calórico e lipídico). Além disso, há correlação com baixo nível intelectual, sedentarismo e associação com comorbidades como a diabetes. Estudos epidemiológicos sugerem que esses fatores poderiam aumentar o risco de desenvolver DA esporádico, o qual representa aproximadamente 99,5% dos casos dessa patologia (7,11). Os outros 0,5% dos casos de DA, o Alzheimer familiar (*Familial Alzheimer's disease* - FAD), o qual acomete pessoas a partir dos 30 anos, estão relacionados à mutações genéticas (7,11,12). Algumas dessas alterações genéticas são mutações nas presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2), proteínas que participam do processamento da proteína precursora amiloide (*Amyloid Precursor Protein* - APP), localizadas nos cromossomos 14 e 1, respectivamente (13,14). Também é descrita uma mutação na APP, localizada no cromossomo 21, levando ao aumento na produção do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) e ainda a presença do alelo $\epsilon 4$ no gene da apolipoproteína E (ApoE), a qual codifica uma proteína com papel essencial no metabolismo do colesterol. Há três isoformas conhecidas de ApoE codificadas por genes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. O alelo $\epsilon 4$ do gene da ApoE foi relacionado à grande suscetibilidade em desenvolver a DA, aumentando em até 5 vezes a probabilidade de desenvolver essa doença. Essa elevada suscetibilidade relaciona-se à baixa afinidade da ApoE4 com o $A\beta$, levando a uma diminuição na remoção do peptídeo do cérebro e, conseqüentemente, ao seu acúmulo (7,11,12,15).

1.1.2. Aspectos fisiopatológicos

A DA é caracterizada por alterações histopatológicas que incluem os emaranhados neurofibrilares (*neurofibrillary tangles* - NFTs) intracelulares e as placas senis ou placas neuríticas extracelulares (16,17).

Os NFTs são encontrados em neurônios piramidais e são formados pelo acúmulo da proteína tau hiperfosforilada. A tau é uma fosfoproteína associada aos microtúbulos (*Microtubule Associated Proteins* – MAPs) que promove estabilização desses, porém quando em sua forma hiperfosforilada perde afinidade pelos microtúbulos, acumulando-se no interior das células em emaranhados insolúveis e apresentando ação neurotóxica (Figura 1.1) (17,18).

Mecanismo de degeneração neurofibrilar

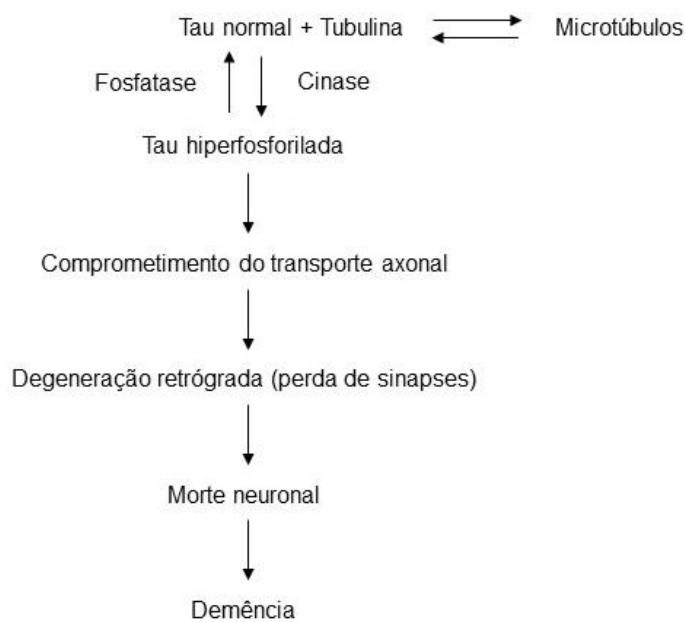


Figura 1.1. Toxicidade induzida pela tau hiperfosforilada. A tau é uma fosfoproteína que promove a estabilização dos microtúbulos. Em sua forma hiperfosforilada a tau perde a afinidade pelos microtúbulos e acumula-se no interior das células em emaranhados insolúveis (NFTs). Dessa forma, ocorre o comprometimento do transporte axonal, perda de sinapses, morte neuronal e demência. Adaptado de Iqbal *et al.*, 2005 (17).

As placas senis são formadas pelo acúmulo do A β , um peptídeo de 40-43 aminoácidos isolado e caracterizado em 1984 por Glenner & Wong (19). O A β é originado a partir do processamento da APP, uma proteína transmembrana relacionada ao desenvolvimento e sobrevivência celular, bem como no reparo pós-lesão. O processamento da APP pode ocorrer por duas vias distintas, a via amiloidogênica e a via não-amiloidogênica. A via não-amiloidogênica é a via de processamento prevalente onde o processamento da APP ocorre inicialmente pela enzima α -secretase na região central do domínio contendo o peptídeo A β , liberando um fragmento solúvel da APP (sAPP α) e permanecendo preso à membrana um fragmento de 83 aminoácidos (C83) que é clivado pelo complexo enzimático γ -secretase, formado pela PS1, nicastrina, APH-1 (*Anterior Pharynx defective*) e pelo estimulador de presenilina 2 (*Presenilin Enhancer 2* - PEN-2), originando o fragmento P3 que não é tóxico. Por outro lado, na via amiloidogênica ocorre a clivagem sequencial da APP pela enzima secretase ou BACE-1 (*Beta-Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme-1*) e pelo complexo γ -secretase. O processamento pela BACE-1 cliva a APP no aminoácido 99 da região C-terminal liberando a forma β -secretada da APP (sAPP β) no espaço extracelular, restando um fragmento de 99 aminoácidos (C99) preso a membrana citoplasmática. Esse fragmento é clivado pelo

complexo γ -secretase liberando para o espaço extracelular um peptídeo de 40 ou 42 aminoácidos ($A\beta_{40}$ ou $A\beta_{42}$), sendo o primeiro produzido em maior quantidade e o segundo mais neurotóxico devido a sua elevada hidrofobicidade e propensão a auto-agregação, assumindo múltiplas formas (Figura 1.2) (10,11,20).

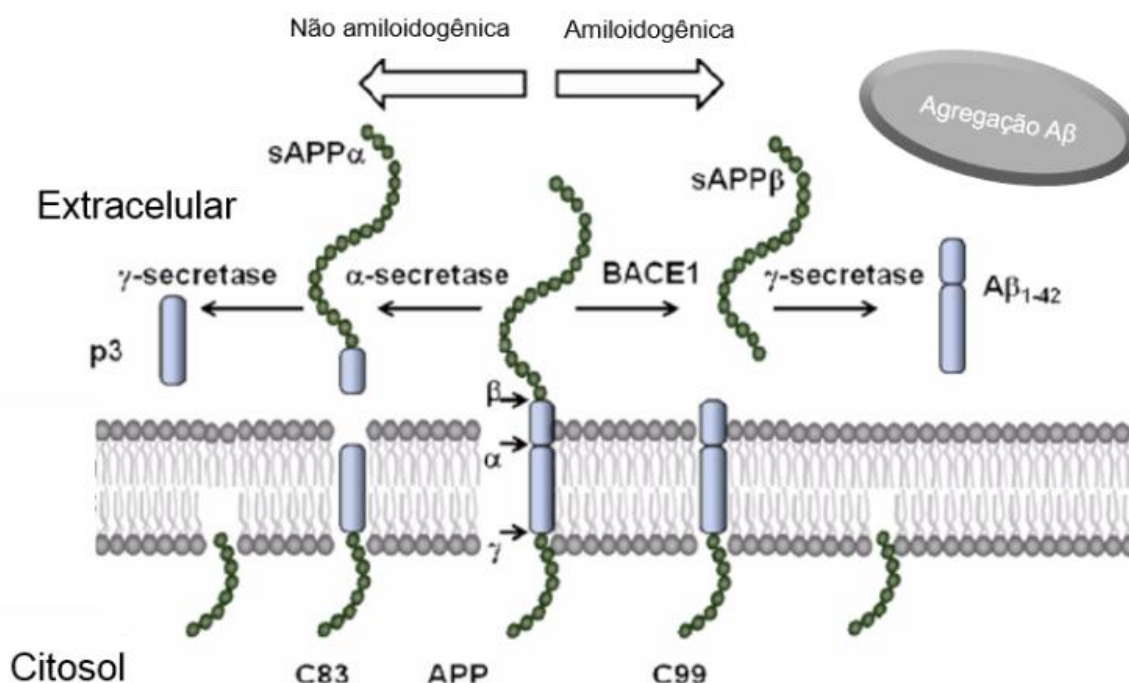


Figura 1.2. Processamento da APP pelas vias amiloidogênica e não-amiloidogênica. No processamento não-amiloidogênico a APP sofre ação inicial da α -secretase onde a clivagem ocorre na região central do domínio contendo o peptídeo $A\beta$, dessa forma prevenindo sua geração. No processamento amiloidogênico, a APP sofre ação inicial da β -secretase gerando ao final da sequência proteolítica o peptídeo $A\beta$. Adaptado de Hong *et al.*, 2010 (20).

A formação das placas senis e os eventos neurodegenerativos associados a presença do peptídeo $A\beta$ em sua forma fibrilar insolúvel originou, em 1992, a hipótese da cascata amiloide. Segundo essa hipótese o acúmulo do peptídeo $A\beta$ com a formação das placas são os agentes patológicos iniciais da DA que levam a uma complexa cascata de alterações bioquímicas (21). Essa hipótese foi reforçada pela caracterização das fibrilas amiloides que são constituídas pelo peptídeo $A\beta$ (19), com a demonstração que o $A\beta$ é tóxico aos neurônios (22) e pela descoberta de que mutações no gene da APP levam a um aumento na produção do $A\beta$. Essas mutações estão correlacionadas com a forma familiar da DA. Embora a DA familiar represente a menor proporção de incidência da doença, ambas as formas, familiar e esporádica, compartilham as mesmas alterações histopatológicas, dando suporte à hipótese (12).

Apesar das evidências indicando uma relação entre a presença das placas senis, constituídas pelo A β em sua forma fibrilar, e o desenvolvimento de DA, alguns trabalhos começaram a questionar a fraca correlação entre as placas senis, a perda de memória e as funções cognitivas. Mucke *et al.* (2000) demonstraram, utilizando animais transgênicos expressando a APP humana (hAPP), que o A β desempenha um papel importante no desenvolvimento de déficits sinápticos independente da presença das placas senis (23). Em 2002, Dodart *et al.* (2002) demonstraram em modelo animal de DA a reversão na perda da memória sem que houvesse diminuição das placas senis quando os animais foram tratados com um anticorpo anti-A β (24).

Como demonstrado inicialmente na hipótese da cascata amiloide, a auto agregação do A β formando as placas senis relaciona-se à toxicidade na DA. Contudo essa não é a única forma de auto-associação do peptídeo que também é encontrado na forma oligomérica, acreditando-se que as placas funcionam como um reservatório dos oligômeros do A β (A β O) (16). Atualmente, diversas evidências indicam que as alterações cognitivas correlacionam-se à capacidade dos A β O em causar disfunção na plasticidade sináptica em estágios iniciais da doença, mesmo na fase assintomática e sem a presença das placas senis (16), e degeneração e morte celular nos estágios finais da doença (10,25). Em 1998 Lambert *et al.* demonstraram a capacidade dos A β O em causar morte de neurônios em cultura organotípica e a inibição da plasticidade sináptica enquanto a formação da forma fibrilar do peptídeo estava bloqueada (26). Alguns anos depois Koistinaho *et al.* (2001), utilizando animais transgênicos que superexpressam APP, demonstraram que mesmo na ausência da placa senil esses animais apresentavam alterações na memória (27).

Dentre os diversos efeitos dos A β O destaca-se a sua capacidade em atacarem às sinapses causando acentuada diminuição na densidade de espinhas dendríticas (25). Além disso, o peptídeo A β pode se ligar a receptores de membrana como receptor nicotínico da acetilcolina 7 α (α 7nAChR) (28), ao receptor glutamatérgico N-Metil-D-Aspartato (NMDA)(29), à proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) (30), o receptor do fator de crescimento nervoso (*Nerve growth factor* - NGF) (31), aos receptores para produtos finais de glicação avançada (*Receptor for Advanced Glycation End Products* - RAGEs) (32) e aos receptores de insulina (33). Essa ligação promove alterações em diversas vias de sinalização celular culminando com modificações nas respostas de depressão de longa duração (LTD – Long-term depression) e potenciação de longa duração (LTP - Long Term Potentiation), ativação de caspases, fosforilação da proteína tau, como

também a modulação de uma cascata de eventos celulares cujo o funcionamento é essencial para a homeostase do SNC (25,34–36). Dentre as vias de sinalização alteradas pelos A β O s destacam-se a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase* - MAPK)(37), a via da PI3K/Akt (fosfatidilinositol-3 cinase), a via do NF κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) e a via das Wnts (família de proteínas glicosiladas ricas em cisteína derivadas do gene *Wingless* de *Drosophila* e do gene *Int-1* de camundongo). Essas vias regulam diversos processos celulares tais como proliferação, diferenciação, apoptose e inflamação, tendo participação na sobrevivência celular e na plasticidade sináptica (37–40). Alterações na via da PI3K/Akt, por exemplo, levam a ativação da proteína glicogênio sintase cinase 3 (*Glycogen synthase kinase 3 beta* - GSK-3 β), uma proteína pró-apoptótica que inibe fatores de transcrição relacionados à sobrevivência celular e desempenha um papel central na fosforilação da proteína tau (34,41).

Os eventos moleculares e celulares envolvidos na patogênese da DA incluem uma forte interação com mecanismos imunológicos no SNC. Os A β O s induzem uma reatividade aberrante dos astrócitos e da microglia tanto no cérebro de camundongos como no cérebro de primatas não-humanos, dessa forma desencadeando uma intensa resposta inflamatória (42–46).

1.1.3. Neuroinflamação e a doença de Alzheimer

A inflamação exerce um papel central nas doenças crônicas e neurodegenerativas. Particularmente na DA alguns trabalhos vêm mostrando que a presença do A β , tanto na forma oligomérica quanto nas placas senis, e dos emaranhados neurofibrilares leva a ativação das células gliais (microglia e astrócitos) (16,20). A ativação dessas células pode levar à neuroinflamação, caracterizada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 4 (IL-4) e 10 (IL-10) e do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β - Transforming Growth Factor), e também pró-inflamatórias, como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (47,48), quimiocinas, como proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) (49), e espécies reativas de oxigênio (ROS)(50). Esse ambiente inflamatório pode promover a ativação das proteínas c-Jun N-terminal (*JNK*), p38 e da proteína cinase regulada por sinais extracelulares (*Extracellular Signal-Regulated Kinase* - *ERK*), as quais fazem parte das MAPKs (51–53). Essas proteínas tem participação no desenvolvimento neuronal e na plasticidade sináptica,

sendo essenciais no processo de aprendizado e de formação da memória (32,37,48). Entretanto, a ativação descontrolada dessas proteínas induzida pelos A β Os correlaciona-se à perda sináptica e conseqüentemente aos danos cognitivos (37,38,54,55). Além disso, o estabelecimento de uma alça de retroalimentação positiva leva a um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias contribuindo com a neuroinflamação e a progressão da DA, conforme demonstrado em análises *post-mortem* do cérebro de pacientes com DA (52,53,56).

A microglia constitui 10% das células presentes no sistema nervoso, sendo as células que desempenham a imunidade inata no cérebro, responsável pela defesa do tecido contra patógenos ou atuando como sensor para danos nesse tecido (57). Durante o processo neurodegenerativo essas células tornam-se ativadas, passando de uma conformação ramificada (repouso) para uma conformação ameboide (ativa) (58), migram em direção às células mortas ou ao local da lesão e promovem a limpeza da região afetada tal qual a ação dos macrófagos ativados do sistema imune periférico (59).

A ativação da microglia pode ocorrer através da ativação dos receptores do tipo Toll (*Toll-like Receptors* - TLRs) os quais reconhecem Padrões Moleculares Associados a Danos (*Damage Associate Molecular Patterns* - DAMPs) ou Padrões Moleculares associados a Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns* - PAMPs), desencadeando uma resposta inflamatória (60). Entre os TLRs, o TLR2 e o TLR4, como também o co-receptor CD14, são os receptores relacionados a DA, como foi demonstrado em cultura primária de microglia (61,62), em camundongos transgênicos (63,64) e em análises *post-mortem* do cérebro de pacientes com DA (63). Além disso, os TLRs interagem com outros receptores como $\alpha\beta$ 1 integrina, CD36, CD47 e receptores *scavenger* classe A que se ligam ao A β , desencadeando a ativação de uma complexa cascata de sinalização celular levando a ativação da microglia e a produção de citocinas pró-inflamatórias (60,65).

Recentemente, alguns trabalhos tem correlacionado variações genéticas no receptor desencadeado expresso nas células mieloides 2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2* - TREM2) com um aumento no risco de desenvolver DA (66). TREM 2 é um receptor de superfície da microglia que apresenta uma elevada expressão nas células associadas as placas senis no cérebro de pacientes e em modelo animal de DA (67,68). Utilizando animais transgênicos Wang *et al.* (2015) demonstraram que animais que não expressam TREM 2 apresentam uma falha na resposta da microglia ao A β , levando ao acúmulo do peptídeo no hipocampo. Além

disso, esses animais apresentavam uma redução na expressão de genes associados à ativação da microglia, como receptores de fagocitose, moléculas co-estimulatórias e citocinas pró-inflamatórias. Esses resultados sugerem que TREM 2 tem papel importante na ativação da microglia frente ao acúmulo do A β (67).

Juntamente com a atividade da microglia em resposta ao A β ocorre o fenômeno da astrogliose reativa, caracterizada pelo aumento no tamanho e mobilidade dos astrócitos, evidenciado pelo aumento nos níveis de GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), um filamento intermediário presente no citoesqueleto dos astrócitos (47,58). Os astrócitos são células de forma estrelada cujas funções incluem suporte bioquímico às células endoteliais da barreira hematoencefálica (*Blood Brain Barrier - BBB*), manutenção da homeostasia iônica e o suprimento de nutrientes ao tecido nervoso (20). Além disso, essas células podem produzir citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (69,70). Além das funções essenciais à manutenção da homeostase do sistema nervoso central (SNC), os astrócitos respondem a todas as formas de danos e doenças que afetam o cérebro através de mudanças na expressão gênica e na estrutura e função celular. Do mesmo modo que a microglia, os astrócitos apresentam TLRs que reconhecem o A β (71) e receptores *scavenger* relacionados a captação do A β (72) levando à ativação de fatores de transcrição que sinalizam para inflamação (65). No cérebro de pacientes com DA já foi demonstrado a colocalização dos astrócitos com as placas senis e os NFTs, como também identificado um aumento nos níveis de GFAP no fluido cérebro-espinhal desses pacientes (58,69,73).

A colocalização dos astrócitos com as placas senis sugere que há produção de quimiocinas nessa região. De fato a microglia que circunda a placa produz MCP-1 que atrai os astrócitos (47). Os astrócitos por sua vez produzem quimiocinas que atraem a microglia. Apesar da ativação dessa célula exercer efeitos neuroprotetores relacionados a eliminação do A β , a liberação de mediadores inflamatórios e de ROS passa a interferir na funcionalidade neuronal (20). Esse efeito promove a ativação dos astrócitos gerando amplificação da resposta inflamatória e levando a um efeito neurotóxico que resulta na liberação de ATP e na amplificação da ativação da microglia. Esse processo forma um ciclo vicioso o que pode estar relacionado a progressão da DA (59).

1.1.4. Alterações epigenéticas na formação da memória

Estudos sobre os mecanismos moleculares da diferenciação e desenvolvimento celular originaram uma nova área na genética denominada pelo pesquisador Conrad Waddington, no fim dos anos 50, de epigenética. Na epigenética são avaliadas as formas como os padrões de expressão gênica são passados aos descendentes, como ocorrem mudanças nessa expressão ao longo do tempo e como fatores ambientais podem interferir nesse mecanismo (74–76).

Alterações epigenéticas referem-se a modificações reversíveis e herdáveis na cromatina, regulando a expressão gênica, que não alteram a sequência de nucleotídeos do ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* – DNA), sendo essenciais em diversos processos celulares. A cromatina é formada pelo DNA e por histonas, proteínas responsáveis pela compactação do DNA e que exercem papel essencial na regulação da transcrição gênica. As histonas variam de 11 Kd a 21 Kd, apresentam cadeia lateral com carga positiva e são divididas em cinco tipos denominadas H1, H2A, H2B, H3 e H4. Dentre os mecanismos de alteração epigenética destacam-se a metilação do DNA, modificações nas histonas e a ação de ácidos ribonucleicos (*ribonucleic acid* – RNA) não codificadores (74–77).

Nos últimos anos vem sendo postulado que modificações na cromatina através da acetilação de histonas podem estar relacionadas à formação e consolidação da memória (76,78–80). O processo de acetilação de histonas é regulado pela atividade das enzimas histona acetiltransferase (HAT) e da histona desacetilase (HDAC), exercendo efeitos sobre a plasticidade sináptica. A HAT adiciona um grupamento acetil à resíduos de lisina, tornando a cromatina relaxada e possibilitando a transcrição gênica. Por outro lado, a HDAC remove o grupamento acetil tornando a cromatina mais compacta, dificultando assim a transcrição gênica (76,79). As HDACs são divididas em quatro subfamílias denominadas classe I, II, III e IV. Em regiões do cérebro relacionadas ao aprendizado e a memória, como o hipocampo e o córtex pré-frontal, há uma maior expressão das HDACs de classe I em relação às de classe II. Dentre as HDACs de classe I, as HDACs 2 e a 3 são as mais expressas nessas regiões (81,82).

Um dos mecanismos epigenéticos relacionados à plasticidade sináptica refere-se ao aumento da acetilação de histonas induzido pela ativação dos receptores NMDA e da proteína ERK no hipocampo em resposta ao LTP (83–86). Um dos primeiros indícios da associação entre a acetilação de histonas e a formação de memórias vem

de um estudo desenvolvido por Levenson *et al.* em 2004, onde os autores observaram que após o teste de medo condicionado ao contexto havia um aumento na acetilação da histona 3 (H3). Por outro lado, após o teste de inibição latente havia um aumento na acetilação de histona 4 (H4). Esses resultados indicaram que diferentes testes comportamentais promovem diferentes modulações epigenéticas no cérebro (83).

Algumas doenças neurodegenerativas como DA, Huntington, Parkinson e isquemia cerebral, além de alguns transtornos do humor como depressão e ansiedade apresentam uma diminuição na acetilação de histonas (76,78,87). Especificamente na DA, alguns estudos demonstraram, tanto *in vitro* como *in vivo*, uma diminuição na acetilação das histonas 3 e 4, bem como um aumento nos níveis de HDAC2, sendo esses resultados correlacionados com o declínio cognitivo observado em modelo animal de DA (88,89). Além disso, foi demonstrado em análises *post-mortem* um aumento nos níveis de HDAC 2 no hipocampo e no córtex de pacientes com DA, sugerindo que os danos cognitivos observados em pacientes parecem compartilhar mecanismos semelhantes aos descritos em modelo animal (89). Em um estudo empregando animais transgênicos que apresentam um aumento na atividade de HDAC 2 o uso de inibidores da HDAC restaurou a acetilação de histonas e promoveu efeito benéfico sobre o aprendizado e a memória (90). Dessa forma, esses inibidores vem sendo empregados em diversos estudos como estratégia para o tratamento da DA (91,92).

1.1.5. Diagnóstico e terapia

Mais de um século após a descrição da DA por Alois Alzheimer não há ainda um método diagnóstico definitivo para a doença, dado a inexistência biomarcadores específicos. Historicamente o diagnóstico da DA foi determinado somente por análises *post-mortem* dos pacientes, ou raramente através de biópsia cerebral. Entretanto, com o avanço na pesquisa nos últimos anos tem sido amplamente aceito que as alterações fisiopatológicas começam a se desenvolver décadas antes dos primeiros sintomas cognitivos (93). As recomendações atuais para o diagnóstico da DA incluem a aplicação do Mini-exame do estado mental (MEEM), alterações nos níveis de biomarcadores do fluido cerebrospinal incluindo a tau e o peptídeo A β , utilização de imagem de ressonância magnética para determinação do volume cerebral e de tomografia por emissão de pósitrons (*Positron Emission Tomography – PET-scan*) para determinação das placas de A β e metabolismo de glicose no cérebro (94–100).

Um diagnóstico relativamente acurado e a determinação da severidade da doença tem sido alcançado quando estes testes são usados em combinação. Entretanto, devido aos custos elevados é improvável que a PET e uma combinação das demais abordagens tornem-se uma rotina no diagnóstico. Além disso, embora o custo dos testes para biomarcadores no líquido cerebrospinal tendem a ser muito menores que aqueles para PET-scan a punção lombar pode ser considerada complicada e invasiva. Dessa forma, a medida de biomarcadores sanguíneos poderia ser uma abordagem mais prática e confortável ao paciente. Entretanto, o principal desafio no desenvolvimento de testes sanguíneos para a identificação de biomarcadores baseados em proteínas específicas do SNC deve-se a mais baixa concentração destas proteínas no sangue que no líquido cerebrospinal. Contudo, o desenvolvimento tecnológico tem gerado técnicas de medidas ultrasensíveis, as quais podem fornecer a sensibilidade analítica necessária para a acurácia na medida de biomarcadores em amostras sanguíneas (101,102).

Apesar dos avanços na pesquisa básica e clínica ao longo das últimas décadas terem melhorado nosso conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares bem como o curso clínico da DA, a terapia permanece bastante limitada. Atualmente os fármacos empregados na terapia da DA apresentam efeito limitado, melhorando apenas os sintomas da doença sem, contudo, alterar seu curso, além de apresentar diversos efeitos colaterais. São empregados na terapia inibidores da acetilcolinesterase e antagonistas do receptor NMDA uma vez que o acúmulo do A β compromete os sistemas colinérgico e glutamatérgico (103,104).

Considerando que na DA ocorre uma diminuição na atividade da enzima colina-acetiltransferase (104), a qual é a responsável pela síntese da acetilcolina, são empregados fármacos que aumentam a disponibilidade sináptica da acetilcolina através da inibição da enzima acetilcolinesterase, responsável pelo catabolismo da acetilcolina. Rivastigmina, tacrina, galantamina e donepezil são os inibidores da acetilcolinesterase aprovados para o tratamento da DA, apesar de apresentarem diversos efeitos colaterais tais como náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, dispepsia, dor abdominal, tonturas, cefaleia e câimbras, como também hepatotoxicidade relacionada ao uso da tacrina, além de serem medicamentos de alto custo (103,104).

Outra abordagem terapêutica relaciona-se ao aumento na atividade do glutamato durante a DA, levando a um aumento na entrada de cálcio na célula que pode gerar degeneração e morte celular. Dessa forma, é empregado um antagonista não-competitivo de receptores NMDA, a memantina. Esse fármaco foi o primeiro e,

atualmente, o único dessa classe a ser aprovado pela FDA para o tratamento dos sintomas de DA moderada a grave. Contudo, a sua utilização apresenta efeitos colaterais tais como diarreia, vertigens, cefaleia, insônia, inquietação, excitação e cansaço (104,105).

Considerando que a DA é uma doença multifatorial as novas estratégias terapêuticas tem focado na terapia combinada devido ao potencial de otimizar a eficácia ao se abordar mais de um processo fisiopatológico ao mesmo tempo e a possibilidade de diminuição de doses minimizando possíveis efeitos colaterais. Esse tipo de estratégia foi empregada com sucesso no tratamento de outras doenças complexas como câncer, tuberculose e doenças cardiovasculares (106).

1.2. Butirato de sódio

Apesar dos avanços oriundos da pesquisa básica voltada para elucidação de mecanismos de patogênese na DA e as diversas abordagens terapêuticas estudadas, não há ainda uma intervenção terapêutica capaz de reverter ou interromper efetivamente a progressão da doença. Isso se deve principalmente por se tratar de uma doença multifatorial envolvendo diversas alterações. Dessa forma, há uma busca por compostos que possam modular a neurodegeneração envolvida nessa patologia (7).

Nesse contexto insere-se o butirato, base conjugada do ácido butírico, um ácido graxo de cadeia curta oriundo do processo de fermentação de polissacarídeos, no metabolismo bacteriano (107,108). Em condições fisiológicas o butirato é produzido no intestino e alcança a circulação sanguínea em concentração micromolar através da veia porta, que conecta o trato gastrointestinal, fígado e baço, produzindo efeitos benéficos no intestino e nos tecidos adjacentes (109,110). Devido ao rápido metabolismo e excreção, apresenta uma meia vida curta de aproximadamente 6 minutos (111,112). Além disso, o butirato apresenta a capacidade de atravessar a BBB, conforme demonstrado em análises por PET-scan, embora de acordo com o estudo conduzido por Kim *et al.* (2013), a concentração de butirato no cérebro é inferior a 0.006% daquela administrada em animais (113,114).

O principal mecanismo de ação do butirato é a inibição da enzima HDAC classe I (107,115). Em estudos farmacológicos o butirato tem sido empregado na sua forma de sal, o butirato de sódio (Figura 1.3), administrado de forma sistêmica, empregando-se doses que variam de 100 a 1200 mg/kg (91,116). Além da inibição de HDAC,

algumas propriedades do butirato incluem atividade anti-tumoral (107), quimiopreventiva (107), anti-inflamatória (117), antioxidante (117), modulação do sistema imunológico e a resistência à insulina (117,118).

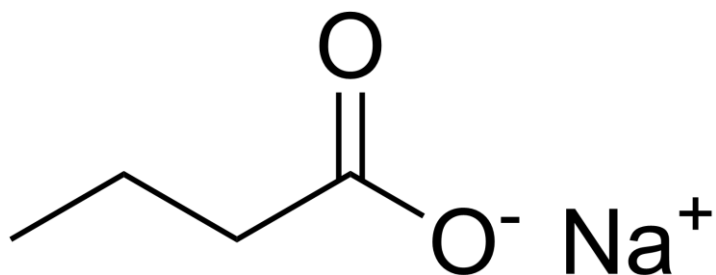


Figura 1.3. Estrutura química do butirato de sódio.

Nos últimos anos tem sido demonstrado a relação entre as bactérias da flora intestinal e seus efeitos reguladores sobre a fisiologia e homeostasia dos hospedeiros. Dentre esses efeitos destacam-se o transporte, metabolismo, crescimento e diferenciação celular, também o controle hepático de lipídeos e carboidratos e ainda o fornecimento de energia para o coração, rim, músculos e cérebro (119,120) Esses efeitos são mediados pelos produtos do metabolismo bacteriano, como os ácidos graxo de cadeia curta, destacando-se o butirato. Além disso, esses produtos exercem papel de moléculas sinalizadoras, sendo capazes de modular os níveis intracelulares de cálcio e ligando-se a receptores acoplados à proteína G (*G-protein coupled Receptor- GPCRs*) expressos no intestino, cólon e adipócitos. A ligação desses produtos ao GPR43, por exemplo, exerce efeitos anti-inflamatórios (121–123).

A nível de sistema nervoso central, a relação dessas bactérias do hospedeiro com o cérebro é denominada "eixo cérebro-intestino" e é capaz de interferir nas funções do órgão (124). Ainda não foi elucidado o mecanismo pelo qual essas bactérias interferem na funcionalidade neural, contudo infere-se que os produtos do metabolismo bacteriano, como os ácidos graxos de cadeia curta, alcancem a circulação sanguínea e cheguem ao tecido cerebral (108), apresentando a capacidade de atravessar a BBB através de transportadores de monocarboxilato 1 (MCT 1) e de transportadores de monocarboxilato acoplados ao sódio 1 (*sodium-coupled monocarboxylate transporters – SMCT 1*) (125,126). Esses receptores são importantes reguladores do sistema imune, tendo participação em eventos neuroinflamatórios, como também no metabolismo energético e na regulação do sistema endócrino. De forma interessante, no cérebro os SMCT1 são expressos nos neurônios, enquanto que MCT 1 são expressos na microglia e nos astrócitos

(108,126,127). Alguns trabalhos vem ressaltando que modificações epigenéticas relacionadas a esses produtos interferem com a função cognitiva e com a plasticidade neural, tendo papel relevante nas doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (91,128,129). Esses efeitos não são dependentes diretamente da passagem do butirato pela BBB, mas podem estar relacionados também, de forma indireta, ao estímulo do sistema nervoso periférico ou da regulação do sistema imunológico (108). Dessa forma, o butirato de sódio vem sendo estudado a nível de sistema nervoso em modelos de demência vascular (130), doença de Huntington (131), Parkinson (132), autismo (133) e DA (134). Alguns dos efeitos do butirato de sódio nessas doenças incluem a modulação da plasticidade neuronal (83), a formação da memória de longa duração (135) e o aumento na expressão de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor* - BDNF) (136). Além disso, o tratamento promove efeitos semelhantes aos efeitos observados com o enriquecimento ambiental (90).

Estudos prévios utilizando camundongos transgênicos CK-p25 e APP/PS1, os quais apresentam danos cognitivos, o tratamento com butirato de sódio foi associado a uma redução no dano cognitivo e nos depósitos de A β , apresentando efeitos moduladores sobre a memória e o aprendizado. Esses resultados foram acompanhados de um aumento na acetilação de histonas e na expressão de genes relacionados ao aprendizado (83,90,134,135). Entretanto, o mecanismo molecular envolvido nesse efeito ainda não está completamente elucidado. Além disso, o uso de animais transgênicos está relacionado à DA de origem familiar, a qual representa apenas 0,5% do total dos casos (7,11). Nesses estudos não foi avaliado o efeito do tratamento com butirato de sódio frente à toxicidade induzida por A β O que surgem nos estágios iniciais e na fase assintomática da DA e estão mais relacionados aos danos cognitivos e disfunções sinápticas (16).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Esta dissertação teve como objetivo central avaliar o potencial efeito neuroprotetor do butirato de sódio (NaB) frente a toxicidade de A β Os como modelo experimental da doença de Alzheimer.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com NaB sobre a acetilação das histonas H2B e H3 frente a toxicidade induzida pelos A β Os em modelo de cultura organotípica de hipocampo de ratos;
- Avaliar o efeito do tratamento com NaB sobre as alterações na memória de curta e longa duração em um modelo *in vivo* de toxicidade induzida pelos A β Os;
- Investigar o efeito do tratamento com NaB sobre mediadores inflamatórios (citocinas pró- e anti-inflamatórias) no soro e no córtex pré-frontal em um modelo *in vivo* de toxicidade induzida pelos A β Os;
- Investigar as possíveis vias de sinalização celular envolvidas no efeito neuroprotetor do NaB em um modelo *in vivo* de toxicidade induzida pelos A β Os.

3. MATERIAIS E METÓDOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* de 6-8 dias de vida e camundongos *Swiss* machos com 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), *campus* Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ. Os ratos foram desmamados imediatamente antes da realização do protocolo de cultura organotípica. Os camundongos foram agrupados em cinco animais por caixa, em gaiolas de polipropileno (30 × 20 × 13 cm) forradas com maravalha, tendo livre acesso à água e alimento, tendo a temperatura controlada 23°C ± 1°C e iluminação artificial com ciclo claro-escuro de 12 horas e mantidos no biotério do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Imagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Todos os experimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC) e do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (CEUA/CCS) sob as licenças número L047/2015 e L052/2016 e 134/15, respectivamente.

3.2. Preparo e caracterização de A β Os

Os oligômeros foram preparados a partir do A β ₁₋₄₂ (American Peptide, Sunnyvale, CA) como descrito por Lambert *et al.* (1998) (26). O peptídeo foi solubilizado em 1mM de hexafluoroisopropanol (HFIP)(Merck, Darmstadt, DE) e o solvente evaporado para produzir um filme seco o qual foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO)(Sigma, St.Louis, MO) estéril para preparar uma solução de 5 mM a qual foi diluída a 100 μ M em PBS e incubado por 24 horas à 4°C. Uma amostra de mesmo volume de DMSO 2% em PBS foi preparada e incubada a 4°C por 24 horas, e usada experimentalmente como controle (veículo). A preparação foi centrifugada a 14.000 *g* por 10 minutos a 4°C a fim de remover agregados insolúveis e o sobrenadante contendo os A β Os foi estocado a 4°C, sendo sua utilização realizada em um período máximo de até 48 horas após o preparo. A caracterização da preparação foi realizada através de cromatografia de gel-filtração com uma coluna de sílica SynChropak® GPC 100 com dimensão da coluna de 250 x 4,6 mm; tamanho do poro de 100 Å e limite de exclusão para proteínas de 3.000-300.000 kDa. A fase móvel usada foi PBS (pH 7), filtrado através de membrana de nitrocelulose Millipore (Billerica, MA) 0,45 μ m, mantido em gelo durante toda a análise. As análises foram feitas através de cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography*, HPLC), com detecção simultânea de absorção à 280 nm e fluorescência com excitação à 275 nm e emissão

à 305 nm. Antes da injeção da amostra de A β Os, a coluna foi lavada durante 1 hora com água Milli-Q[®] e equilibrada por 1 hora com a fase móvel, ambas com fluxo de 0,5ml/minuto. Inicialmente, 50 μ L de veículo (DMSO 2% em PBS) foram injetados, com fluxo de 0,5 ml/minuto e tempo de corrida de 15 minutos. Em seguida, a coluna foi re-equilibrada com a fase móvel durante 15 minutos e 50 μ L de A β Os foram injetados, e a análise feita com os mesmos parâmetros usados para o veículo. A concentração de proteína foi determinada utilizando o kit de BCA (Pierce, Deerfield, IL) (137,138). Essas análises foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas da UFRJ.

3.3. Cultura organotípica de hipocampo e toxicidade induzida pelos A β Os

A cultura organotípica de hipocampo de ratos foi preparada segundo o método descrito por Stoppini *et al.* (1991) (139), com algumas adaptações (140). Os hipocampos de ratos *Wistar* de 6-8 dias foram fatiados em 400 μ m com auxílio de um fatiador de tecido *Mcllwain chopper* (The Mickle Laboratory Engineering Co). As fatias foram transferidas às membranas Millicell e estas para placas de cultivo de 6 poços sob condições estéreis. As culturas foram mantidas em MEM (*Medium Essential Minimal*) contendo antibiótico (sulfato de gentamicina 0,100 mg/ml) e antifúngico (anfotericina B 1%), suplementado com 25% de soro de cavalo inativado, 36 mM de glicose, 25 mM de HEPES e 4 mM de NaHCO₃ em incubadora a 37°C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂ por 14 dias. O meio foi trocado duas vezes por semana. No 14° de cultivo as culturas foram expostas a 500 nM de A β Os por um período de 24 horas. Simultaneamente à exposição aos A β Os, no 14° de cultivo, as culturas foram tratadas com 2,5 mM ou 5 mM de butirato de sódio (NaB) e o tratamento foi mantido por 24 horas.

3.3.1. Incorporação do Iodeto de Propídeo

Vinte e quatro horas após o tratamento com NaB e a exposição aos A β Os foi adicionado 3 μ M de iodeto de propídeo (IP) ao meio de cultivo e incubado por 1 hora com o objetivo de quantificar a porcentagem de morte celular da cultura organotípica. O IP é um marcador de morte celular que se difunde para o interior das células que apresentam comprometimento na integridade da membrana celular, ligando-se aos ácidos nucleicos. Após a incubação, as culturas foram fotografadas utilizando um microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) com um filtro padrão de rodamina. As imagens capturadas foram analisadas através do programa de análise de imagens

Scion Image (<http://www.scioncorp.com>) e a porcentagem da morte celular foi determinada de acordo com a intensidade da fluorescência densitometricamente. Para a quantificação do dano neural, a porcentagem de área que expressa a fluorescência do IP acima do nível de fundo foi calculada em relação à área total de cada fatia. A intensidade do IP, que significa morte celular, foi expressa como uma porcentagem de dano celular: morte celular (%) = $F_d / F_0 \times 100$, onde F_d é o valor de fluorescência do IP da área morta das fatias do hipocampo e F_0 é a área total de cada fatia do hipocampo. Como controle positivo, 1 mM de glutamato, um neurotransmissor excitatório que quando em elevadas concentrações leva a morte celular por necrose, foi adicionado a um poço e mantido por 24 horas, seguido pela incubação com IP e a captura das imagens (141,142).

3.4. Injeção intracerebroventricular dos A β O_s e tratamento dos animais com butirato de sódio

Para a injeção intracerebroventricular (icv), os animais foram anestesiados por cerca de 7 minutos com Isoflurano 2,5 % (Cristália, São Paulo, Brasil) usando um sistema vaporizador (Norwell, MA) e foram cuidadosamente contidos apenas durante o procedimento de injeção. Uma agulha de 2,5 milímetros e 30G foi inserida unilateralmente 1 milímetros à direita do ponto equidistante da linha média do olho e 1 milímetro posterior à uma linha desenhada através da base anterior dos olhos (138). Foram injetados 10 picomoles de A β O_s ou veículo (PBS) (volume final 3 μ l) em 30 segundos. Animais com sinais de hemorragia ou de erro no local de injeção foram descartados do experimento (143,144).

Para o tratamento dos animais o butirato de sódio (NaB, Sigma-Aldrich) foi solubilizado em solução salina em uma concentração final de 200 mg/ml. A solução foi preparada diariamente. Os animais foram divididos em 5 grupos (10 animais em cada grupo) denominados da seguinte ordem: Grupo controle: animais que receberam PBS via icv e foram tratados com solução salina; Grupo NaB 750: animais que receberam PBS via icv e foram tratados com 750 mg/Kg de NaB; Grupo A β O_s: animais que receberam A β O_s via icv e foram tratados com solução salina; Grupo A β O_s NaB 300: animais que receberam A β O_s via icv foram tratados com 300 mg/Kg de NaB; Grupo A β O_s NaB 750: animais que receberam A β O_s via icv foram tratados com 750 mg/Kg de NaB. A dose de tratamento com NaB foi escolhida a partir de uma revisão da literatura (90,115,134,145).

A administração do NaB foi realizada pela via intraperitoneal (IP) (volume final 60 µl para a dose de 300 mg/Kg e 150 µl para a dose de 750 mg/Kg), diariamente durante 8 dias, sendo a primeira dose administrada 24 horas antes da injeção de AβOs.

3.5. Reconhecimento de objeto (RO)

O experimento de RO baseia-se na preferência natural dos roedores em explorar um objeto novo em detrimento à um objeto familiar, sendo uma ferramenta útil para avaliar alterações cognitivas. Esse teste foi realizado 24 horas e 5 dias após a injeção de AβOs. A fim de avaliar a memória de curta duração os animais foram colocados um por vez em uma caixa de madeira compensada nas dimensões (cm) de 30x30x45 e submetidos a três sessões distintas de 5 minutos cada com intervalo de 1 hora entre cada sessão. Foram utilizadas 4 caixas separadas simultaneamente. Na primeira sessão foi permitido a exploração da caixa para habituação dos animais. Na segunda sessão foram adicionados à caixa dois objetos de plástico idênticos lado a lado (cerca de 10 centímetros de distância entre os mesmos), tendo a mesma textura, cor e tamanho, e na terceira sessão um dos objetos foi substituído por um objeto novo. As sessões foram filmadas com auxílio do software ANY-maze e o tempo de exploração de cada objeto foi quantificado sendo a exploração definida como o toque no objeto ou o ato de farejá-lo. O tempo de exploração de cada objeto foi convertido em percentual e expresso como porcentagem de reconhecimento do objeto, a qual foi obtida através da multiplicação do tempo de exploração de cada objeto por 100 e o valor resultante dividido pelo tempo total de exploração. Após cada sessão os aparatos e os objetos foram higienizados com álcool 70% (146).

3.6. Medo condicionado ao contexto

A fim de avaliar a memória de longa duração foi realizado o experimento de medo condicionado ao contexto 7 dias após a injeção dos AβOs. Esse teste avalia o aprendizado associativo empregando a associação de um estímulo neutro com um aversivo, sendo dependente da atividade do hipocampo (147). O experimento foi realizado utilizando o sistema *Statle and Fear Conditioning System* (Panlab, Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha), o qual consiste em uma caixa de dimensões (cm) 40x25x30, possuindo as paredes laterais e do fundo construídas em acrílico preto, enquanto a porta situada na parede frontal é de acrílico transparente. O piso da caixa é constituído por uma grade com 17 hastes eletrificadas de 6 milímetros de diâmetro cada, separadas 1 centímetro uma da outra e conectadas a um gerador de choques,

ligada a uma interface controlada por um computador e posicionada sobre um sensor de movimento conectado ao computador. O equipamento está contido em uma caixa (64x53x48 centímetros) de atenuação sonora construída em metal e revestida internamente com isolante acústico, evitando assim a interferência de estímulos ambientais durante a execução dos procedimentos. O experimento foi dividido nas sessões de treino e teste. Na sessão de treino os animais foram colocados na caixa (um animal de cada vez), permitindo seu livre movimento durante 4 minutos e 30 segundos. Após 3 minutos os animais receberam dois choques com intensidade de 0,3 mA e duração de 2 segundos cada, sendo o intervalo entre os choques de 30 segundos. Na sessão teste, 24 horas após a sessão treino, para avaliar a memória de longa duração os animais são colocados na mesma caixa da sessão de treino por 5 minutos, porém não receberam o choque e o tempo de congelamento (*freezing*) foi registrado, sendo esse comportamento definido como a ausência total de movimentos do corpo (exceto aqueles relacionados à respiração). As caixas foram higienizadas após cada sessão com álcool 70%.

3.7. Coleta das amostras

Ao final dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados (90 mg/Kg de cloridrato de Xilazina 2% + 30 mg/Kg de cloridrato de Cetamina 10%) e o sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado à 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80°C para análises posteriores. O cérebro foi removido, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram coletados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para análises posteriores.

3.8. Preparo das amostras e dosagem de proteína

A quantificação de proteínas foi realizada empregando-se kit PIERCE™ BCA Protein Assay. O método BCA se baseia na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo com o ácido bicinconínico (BCA). Inicialmente o hipocampo foi homogeneizado em solução de lise RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Triton X100 1%, 0,25% deoxicolato de sódio, 100 mM EDTA) e inibidores de protease e fosfatase (Thermo Scientific, 1:100) e o córtex em PBS 1x contendo Triton (0,1%) e um coquetel de inibidores de proteases (Complete®, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça). A curva padrão foi preparada seguindo orientação do fabricante. Foram usadas placas de 96 poços e as amostras foram adicionadas à placa na diluição 1:25. Em seguida foram adicionados a placa

200 µL/poço de solução contendo BCA e sulfato de cobre na proporção 1:50. A placa foi mantida por 15 minutos à 60° C em estufa e em seguida foi realizada leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

3.9. Western blotting

Para a análise de proteínas envolvidas na sinalização celular frente à toxicidade dos AβOs, quantidades iguais de proteínas foram separadas através de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE, 12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, RPN1210C). As membranas foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente numa solução de bloqueio (TBS - *Tris-buffered saline*) contendo albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin* – BSA) 5% e 0,1% de Tween-20). Em seguida, as membranas foram incubadas por 18 horas com anticorpos específicos para as proteínas de interesse: H2B (Cell Signalling Technology, 1:1000), H3 (Cell Signalling Technology, 1:1000), GFAP (Thermo Fischer, 1:1000), JNK (Cell Signalling Technology, 1:1000), ERK (Cell Signalling Technology, 1:1000), p38 (Cell Signalling Technology, 1:1000) e β-actina (Abcam, 1:20.000), diluídos na solução de bloqueio (TBS - *Tris-buffered saline*) contendo albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin* – BSA) 5% e 0,1% de Tween-20), e posteriormente com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase, *anti-mouse* (Cell Signalling Technology, 1:1000) ou *anti-rabbit* (Cell Signalling Technology, 1:1000), de acordo com as instruções do fabricante. As bandas foram visualizadas utilizando um kit de quimioluminescência (*SuperSignal West Pico chemiluminescent reagent*, Pierce). As imagens foram capturadas utilizando *C-DiGit® Blot Scanner* ou com filmes de raio-X. Os secundários fluorescentes empregados para captura no Odyssey® (Odyssey® CLx Imaging System, Li-COR) foram IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG (H+L), 0.1 mg ou IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+L), 0.1 mg da Li-COR. A intensidade das bandas foi analisada pelo programa NIH Image J, as proteínas foram normalizadas pela β-actina e o resultado foi expresso em porcentagem (%) em relação ao grupo controle.

3.10. ELISA

A fim de avaliar o perfil de citocinas no córtex e no soro dos animais foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) sendo seguidas as recomendações do fabricante (R&D System). Inicialmente o córtex foi homogeneizado em uma solução PBS 1x contendo Triton (0,1%) e um coquetel de

inibidores de proteases (Complete[®], Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça). Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 10.621 g por 10 minutos à 4°C, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados à -80° C para posterior dosagem de citocinas.

Para a quantificação de IL-6 (“Mouse IL-6 DuoSet ELISA”, Cat. DY406), IL-10 (“Mouse IL-10 DuoSet ELISA”, Cat. DY417) e TNF- α (“Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA”, Cat. DY410) foram empregadas placas de 96 poços, nas quais foi adicionado 50 μ L/poço de anticorpos de captura diluídos em uma solução tampão (NaCl 1.5M, H₃BO₄ 0,5M e NaOH 1N, pH = 7.4) e incubadas por 12 horas à 4°C. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com 200 μ L/poço de solução tampão 1 (timerosal, KPO₄ 1M e Tween 20 0,005%) e posterior adição de 200 μ L/poço de solução contendo PBS e albumina bovina (BSA, 1%) por 1 hora a fim de realizar o bloqueio de sítios inespecíficos. Posteriormente as placas foram novamente lavadas 3 vezes (200 μ L/poço) com a solução tampão 1. Para a quantificação de citocinas no soro as amostras foram adicionadas diretamente à placa. Para a quantificação de citocinas no córtex as amostras foram adicionadas aos poços na diluição 1:100. Foi realizado um período de incubação de 2 horas à 37°C e, então, os poços foram lavados 3 vezes com a solução tampão 1. Na sequência foi adicionado 50 μ L/poço do anticorpo de detecção biotilado (50 μ g/mL) por um período de incubação de 1 hora a temperatura ambiente, seguido de nova lavagem (200 μ L/ poço) com solução tampão 1 e um período de incubação de 1 hora a temperatura ambiente com 50 μ L/ poço da mistura neutravidina *horseradish peroxidase* (HRP) diluído no tampão 2 (soro fetal bovino 2% em PBS). Após a última lavagem com 200 μ L/poço da solução tampão 1, foi adicionado 50 μ L/poço do substrato (K-Blue[®]) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (entre 5 a 30 minutos), a qual foi interrompida pela adição de 50 μ L/poço de H₂SO₄ (0,19 M). A leitura das placas foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos como pg/ml para o soro e pg/mg de proteína para o córtex pré-frontal.

3.11. Análise estatística

Empregando o software “GraphPad Prism 6” foi realizada análise da distribuição dos dados através do teste de *D’Agostino-Pearson*. Os dados são expressos como média mais ou menos o erro padrão da média, analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da preparação de A β Os

Inicialmente, foi realizada a caracterização da preparação de A β Os através de cromatografia de gel-filtração (Figura 4.1). O resultado revelou que a formulação apresentava uma mistura de oligômeros de baixo (22.6 kDa) e alto (154 kDa) peso molecular.

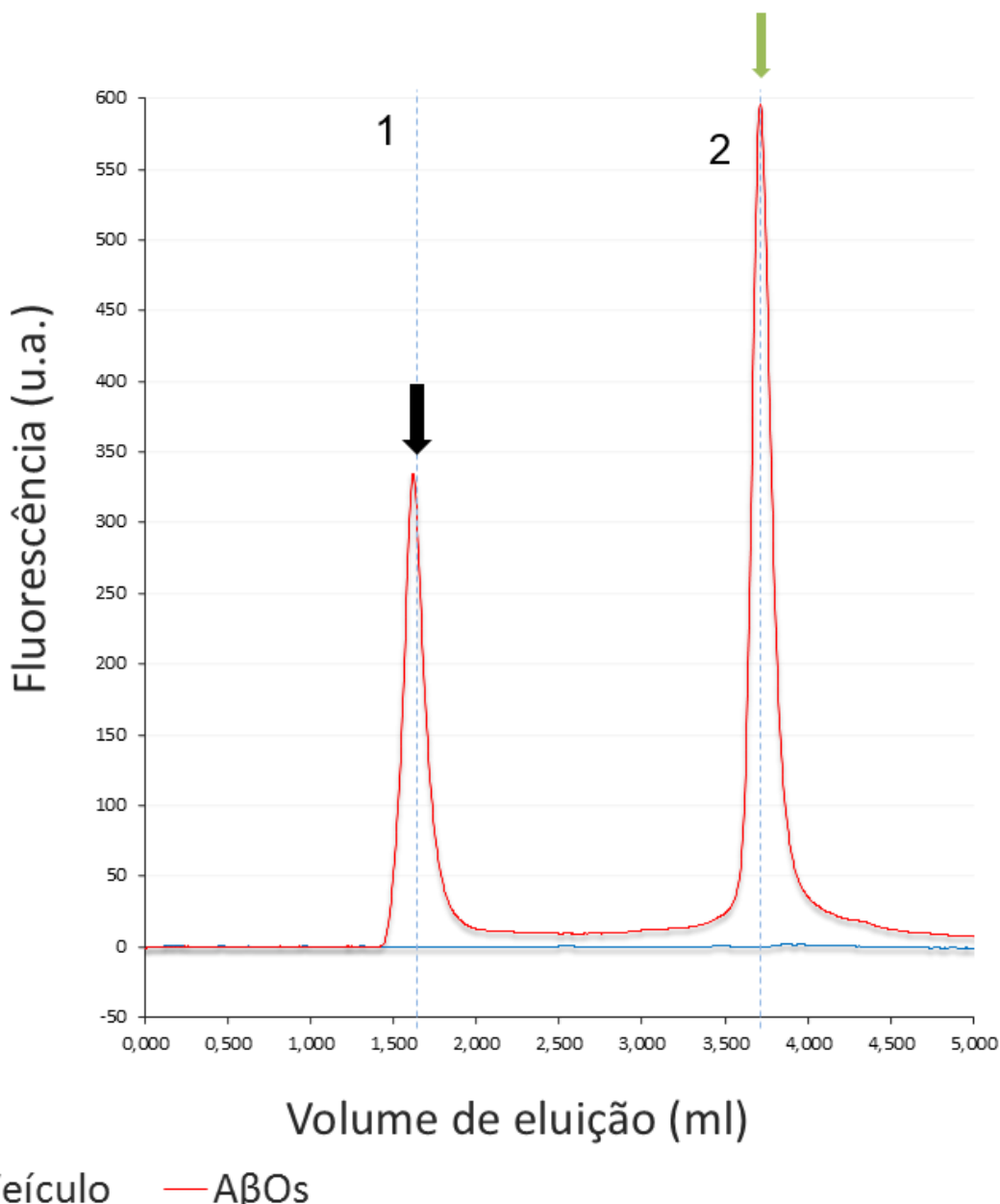


Figura 4.1. Caracterização da preparação de A β Os. Cromatograma representativo de gel-filtração de A β Os com os picos de fluorescência de preparações de veículo (em azul) e A β Os (em vermelho). Observam-se picos correspondentes a agregados de alto peso (seta preta) e de baixo peso molecular (seta verde). Concentração: 43 μ M. 20 μ l de injeção manual. Massa molecular ponderal média (Mw) pico 1 (A β Os): 1.625 ml (154 kDa) e pico 2 (A β Os): 3.725 ml (22.6 kDa).

4.2. Efeito do butirato de sódio em cultura organotípica de hipocampo exposta aos A β Os.

4.2.1. Análise da incorporação do iodeto de propídeo (IP)

Na primeira etapa do nosso trabalho, avaliamos a viabilidade celular da cultura organotípica através da análise da incorporação do IP. Como pode ser observado nas figuras 4.2 e 4.3, os grupos expostos somente aos A β Os e os grupos tratados com NaB, em ambas as concentrações utilizadas, apresentaram uma baixa incorporação do IP (Figura 4.2) com uma porcentagem de morte celular inferior à 5%, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle. O grupo exposto ao glutamato, empregado como controle positivo, apresentou cerca de 85% de morte celular (Figura 4.3).

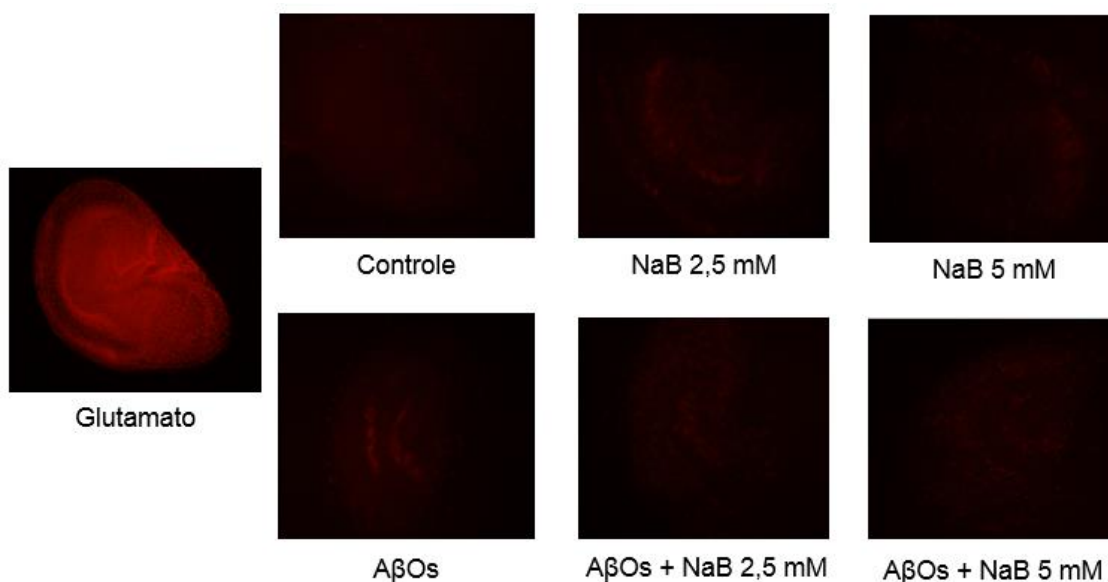


Figura 4.2. Imagens representativas da incorporação de IP. Culturas organotípicas de hipocampo foram marcadas com iodeto de propídeo 24 horas após o tratamento com diferentes concentrações de NaB (2,5 ou 5 mM) e a exposição à 500 nM de A β Os. O glutamato (1mM) foi usado como controle positivo. As imagens são representativas de cinco experimentos independentes.

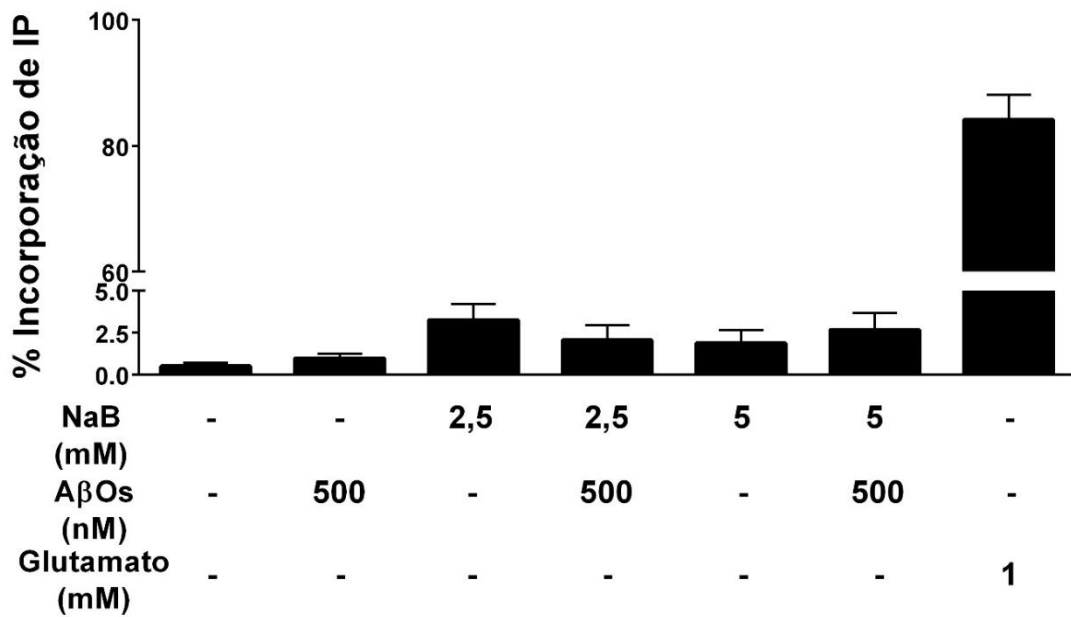


Figura 4.3. Análise quantitativa da morte celular. Vinte e quatro horas após o tratamento com diferentes concentrações de NaB (2,5 ou 5 mM) e a exposição à 500 nM de AβOs as culturas foram incubadas com iodeto de propídeo e o percentual de morte celular foi analisado como descrito na metodologia. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média, n=8-18 animais por grupo, quatro experimentos independentes (ANOVA de uma via). O glutamato (1mM) foi usado como controle positivo.

4.2.2. Acetilação de histonas

O efeito do tratamento com NaB sobre a acetilação das histonas H2B e H3 na cultura organotípica de hipocampo de ratos foi avaliado através de *Western blotting*. Como pode ser observado na figura 4.4, os grupos tratados com NaB, em ambas as concentrações, e expostos aos AβOs apresentaram um aumento significativo na acetilação de H3 em relação ao grupo exposto somente aos AβOs. Além disso, o grupo exposto somente aos AβOs não apresentou alteração significativa na acetilação de H3 quando comparado ao grupo controle.

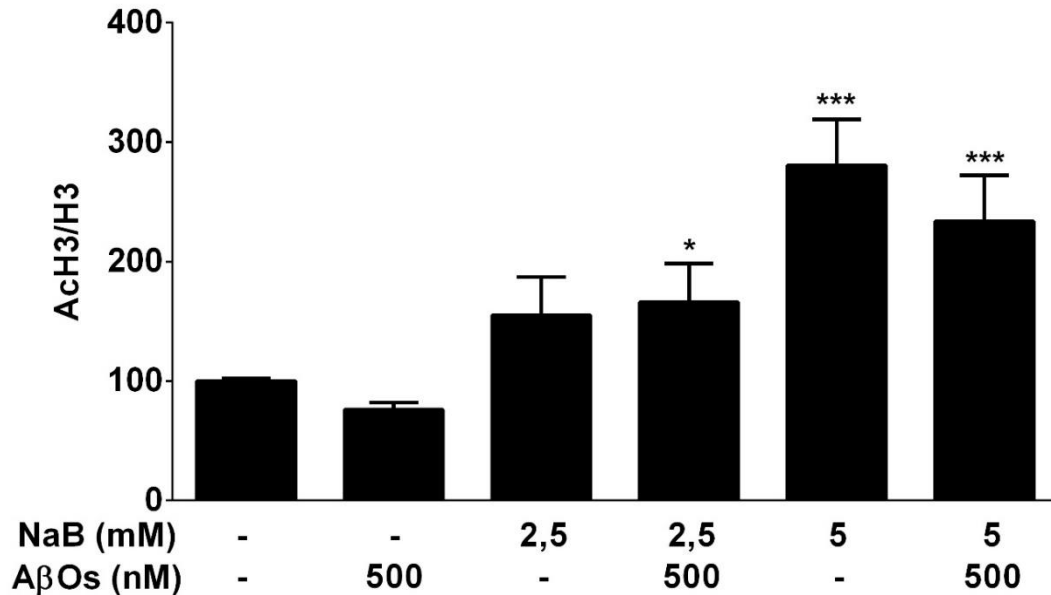
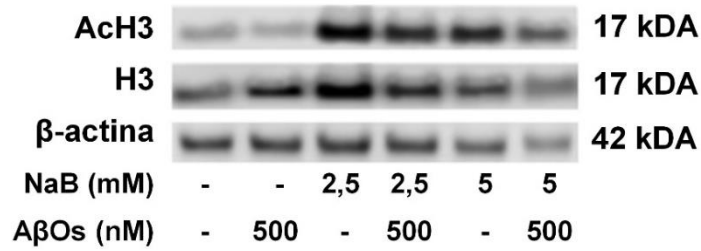


Figura 4.4. Efeito do tratamento com NaB sobre acetilação da histona H3. As culturas foram tratadas com NaB (2,5mM ou 5 mM) simultaneamente à exposição aos A β Os (500 nM). O imunoconteúdo de H3 foi detectado em lisados celulares através de *Western blotting* usando anticorpo específico. Imagem representativa do imunoconteúdo e quantificação mostrando a relação AcH3/H3. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n=5-6, três experimentos independentes (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, *p<0,05; ***p<0,001, diferença significativa em relação ao grupo exposto somente aos A β Os).

Na figura 4.5 observamos que apenas o tratamento com 2,5 mM de NaB no grupo exposto aos A β Os aumentou de modo significativo a acetilação de H2B em relação ao grupo que foi exposto somente aos A β Os. Além disso, o grupo exposto somente aos A β Os não apresentou alteração significativa na acetilação de H2B quando comparado ao grupo controle.

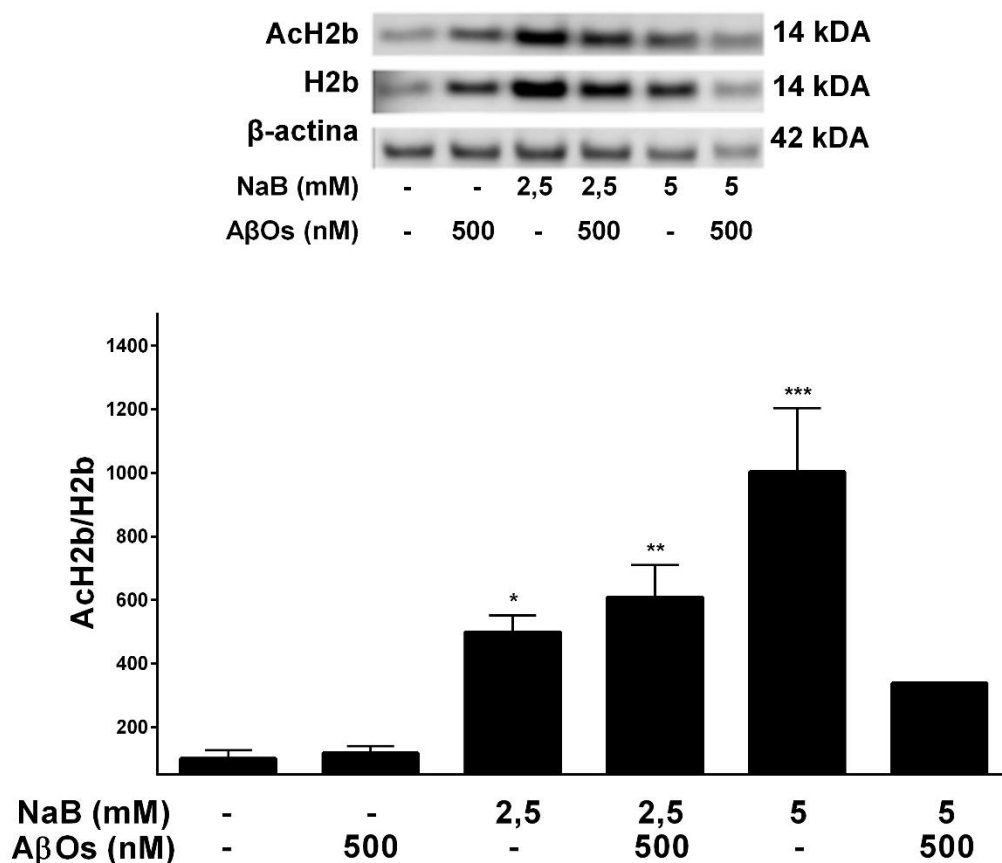


Figura 4.5. Efeito do tratamento com NaB sobre acetilação de H2b. As culturas foram tratadas com NaB (2,5mM ou 5 mM) simultaneamente à exposição aos A β Os (500 nM). O imunoc conteúdo de AcH2B foi detectado em lisados celulares através de *Western blotting* usando anticorpos específicos. Imagem representativa do imunoc conteúdo e quantificação mostrando a relação AcH2B/H2B. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n=2-4 animais por grupo, dois experimentos independentes. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, diferença significativa em relação ao grupo exposto somente aos A β Os).

4.3. Efeito do butirato de sódio sobre as alterações comportamentais induzidas pelos A β Os

4.3.1. Análise comportamental

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com diferentes doses de NaB sobre as alterações na memória de curta e longa duração induzidas pela injeção icv dos A β Os em camundongos foram realizados os testes de RO e de medo condicionado ao contexto.

Inicialmente, foi avaliada a memória de curta duração 24 horas após a injeção de A β Os através do teste de RO. Na sessão treino (Figura 4.6 A) observamos que não houve diferença significativa no tempo de exploração dos animais entre os objetos

idênticos. Na sessão teste (Figura 4.6 B) observamos que os animais que foram injetados com A β Os não foram capazes de distinguir entre o objeto novo e o familiar conforme evidenciado pelo percentual igual de exploração dos objetos. Por outro lado, os animais que foram injetados com A β Os e tratados com NaB, em ambas as doses empregadas, foram capazes de distinguir entre o objeto novo (N) e o familiar (F), conforme evidenciado pelo maior percentual de exploração do objeto novo em relação ao familiar.

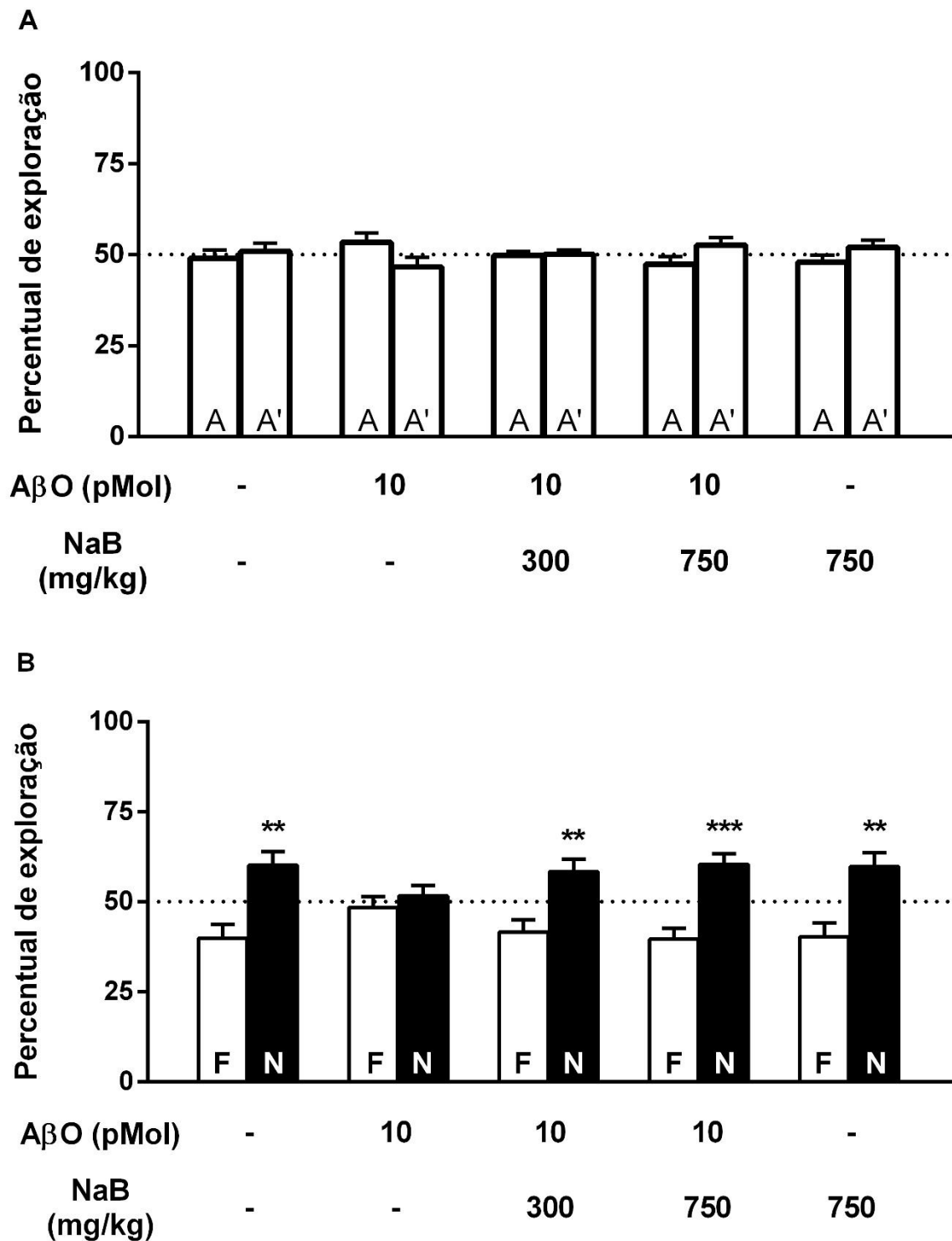


Figura 4.6. Efeito do tratamento com NaB sobre a memória de curta duração no RO realizado 24 horas após a injeção de AβOs. Os animais foram tratados diariamente com NaB (300 mg/Kg ou 750 mg/Kg) ou salina via IP. Vinte e quatro horas após o início do tratamento com NaB 10 picomoles de AβOs foram injetados no ventrículo lateral direito e 24 horas após a injeção dos AβOs foi realizado o experimento de RO. O gráfico mostra a porcentagem do tempo de exploração dos objetos idênticos (A e A') na sessão de treino (A) e dos objetos familiar (F) e novo (N) na sessão teste (B). As colunas indicam média ± erro padrão da média, n=6-10 animais em cada grupo experimental, um experimento independente (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, ** p<0,01; *** p<0,001, para diferença significativa no percentual de exploração entre o objeto familiar (F) e o objeto novo (N)).

Uma vez que foi realizada uma única injeção icv de A β Os durante o experimento, foi aplicado um novo teste de RO cinco dias após a injeção dos A β Os para verificar se os danos na memória de curta duração observados no teste realizado 24 horas após a injeção ainda estavam presentes. Da mesma forma que no RO realizado 24 horas após a injeção dos A β Os, não houve diferença significativa na exploração dos objetos idênticos entre os grupos na sessão treino (Figura 4.7 A). Na sessão teste (Figura 4.7 B) os animais que foram injetados com A β Os não foram capazes de distinguir entre o objeto novo (N) e o familiar (F). Já os animais que receberam a injeção com A β Os e foram tratados com NaB, em ambas as doses empregadas, foram capazes de distinguir entre o objeto novo e o familiar, conforme evidenciado pelo percentual maior de exploração do objeto novo em relação ao familiar. Esses resultados demonstram que uma única injeção de A β Os é capaz de promover danos na memória de curta duração em camundongos e que o tratamento NaB é capaz de bloquear esse efeito.

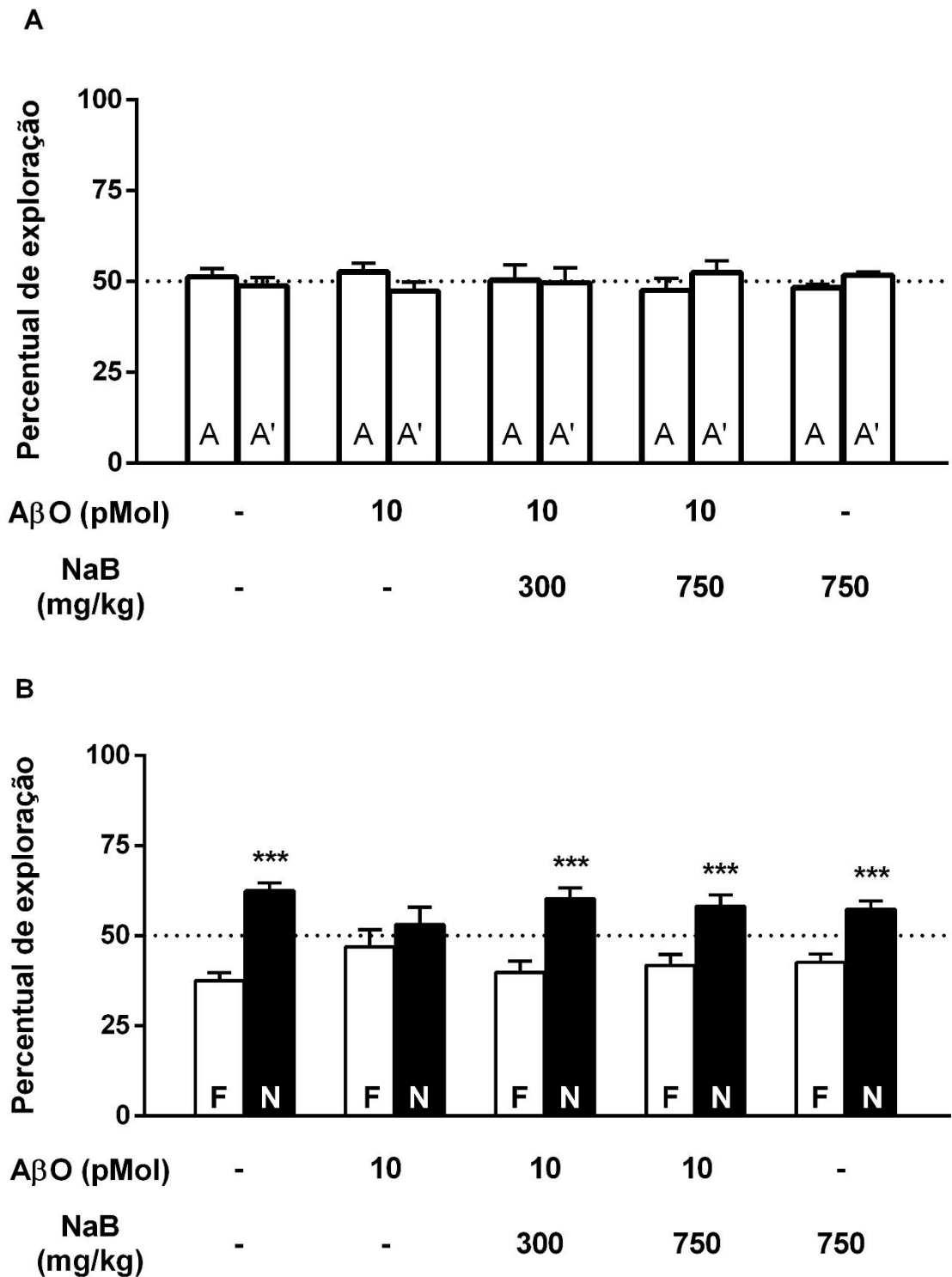


Figura 4.7. Efeito do tratamento com NaB sobre a memória de curta duração no RO realizado 5 dias após a injeção de AβOs. Os animais foram tratados diariamente com NaB (300 mg/Kg ou 750 mg/Kg) ou salina via IP. Vinte e quatro horas após o início do tratamento com NaB 10 picomoles de AβOs foram injetados no ventrículo lateral direito e 5 dias após a injeção dos AβOs foi realizado o experimento de RO. O gráfico mostra a porcentagem do tempo de exploração dos objetos idênticos (A e A') na sessão treino (A) e dos objetos familiar (F) e novo (N) na sessão teste (B). As colunas indicam média \pm erro padrão da média, n=7-10 animais em cada grupo experimental, um experimento independente (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, *** p<0,001, para diferença significativa no percentual de exploração entre o objeto familiar (F) e o objeto novo (N)).

Na sequência, para avaliação da memória de longa duração foi realizado o teste de medo condicionado ao contexto. A figura 4.8 mostra a porcentagem de congelamento (*freezing*) dos animais. Como pode ser observado, os animais injetados com A β Os apresentaram uma tendência à diminuição da porcentagem de *freezing* em relação aos animais controle. Já os animais que foram injetados com A β Os e tratados com NaB, em ambas as doses administradas, apresentaram níveis de *freezing* maiores que o grupo injetado com A β Os, equiparando-se ao grupo controle. Além disso, o grupo tratado com NaB que não recebeu injeção de A β Os, não apresentou uma porcentagem de *freezing* significativamente diferente do grupo controle. Esse resultado sugere que os animais injetados com A β Os apresentam danos na memória de longa duração e que o tratamento com NaB foi capaz de bloquear esse efeito.

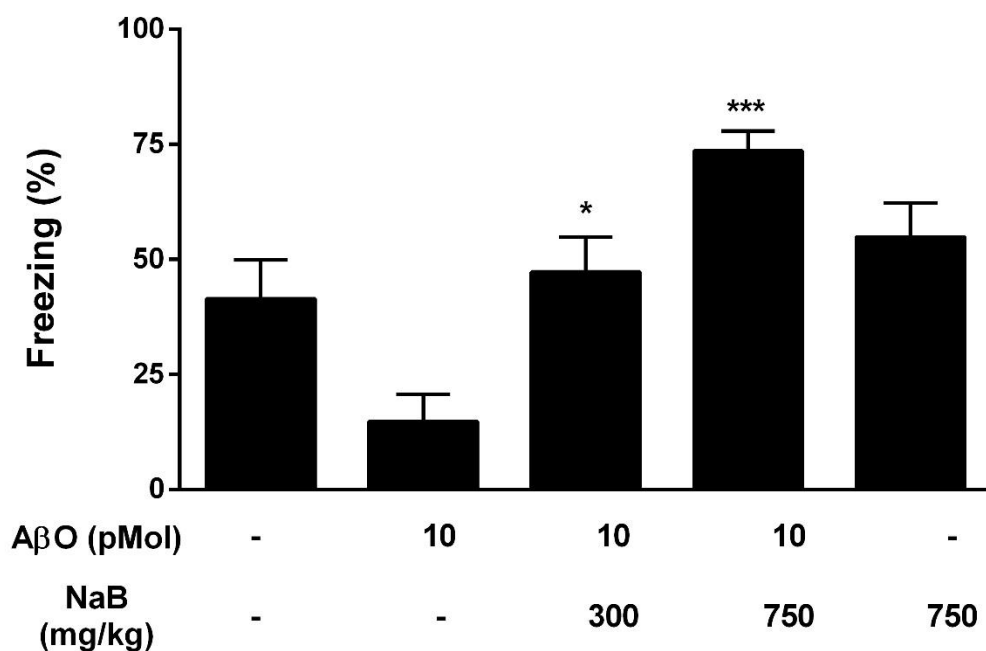


Figura 4.8. Efeito do tratamento com NaB sobre a memória de longa duração. Os animais foram tratados diariamente com NaB (300 mg/Kg ou 750 mg/Kg) ou salina via IP. Vinte e quatro horas após o início do tratamento com NaB os animais receberam uma injeção icv de A β Os (10 picomol) ou veículo. No sexto dia após a injeção dos A β Os foi iniciado o experimento de medo condicionado ao contexto. O gráfico mostra a porcentagem de congelamento (*freezing*) dos animais. As colunas indicam média \pm erro padrão da média, n=7-10 animais em cada grupo experimental, um experimento independente (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, *p<0,05; ***p<0,001, para diferença significativa na porcentagem de *freezing* em relação ao grupo somente injetado com A β Os).

4.3.2. Sinalização Celular e neuroinflamação

A fim de investigar o efeito do tratamento com NaB sobre mediadores inflamatórios em um modelo *in vivo* de toxicidade induzida pelos A β Os, os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias foram avaliados no soro e no córtex pré-frontal dos animais por ELISA. Como pode ser observado na figura 4.9, houve um aumento significativo nos níveis de TNF- α (A) e IL-6 (B) no córtex pré-frontal dos animais injetados com A β Os. Já os animais injetados com A β Os que receberam tratamento com NaB, em ambas as doses administradas, não apresentaram esse aumento. Além disso, o grupo que recebeu NaB sem a injeção de A β Os não apresentou diferença nos níveis dessas citocinas em relação ao grupo controle.

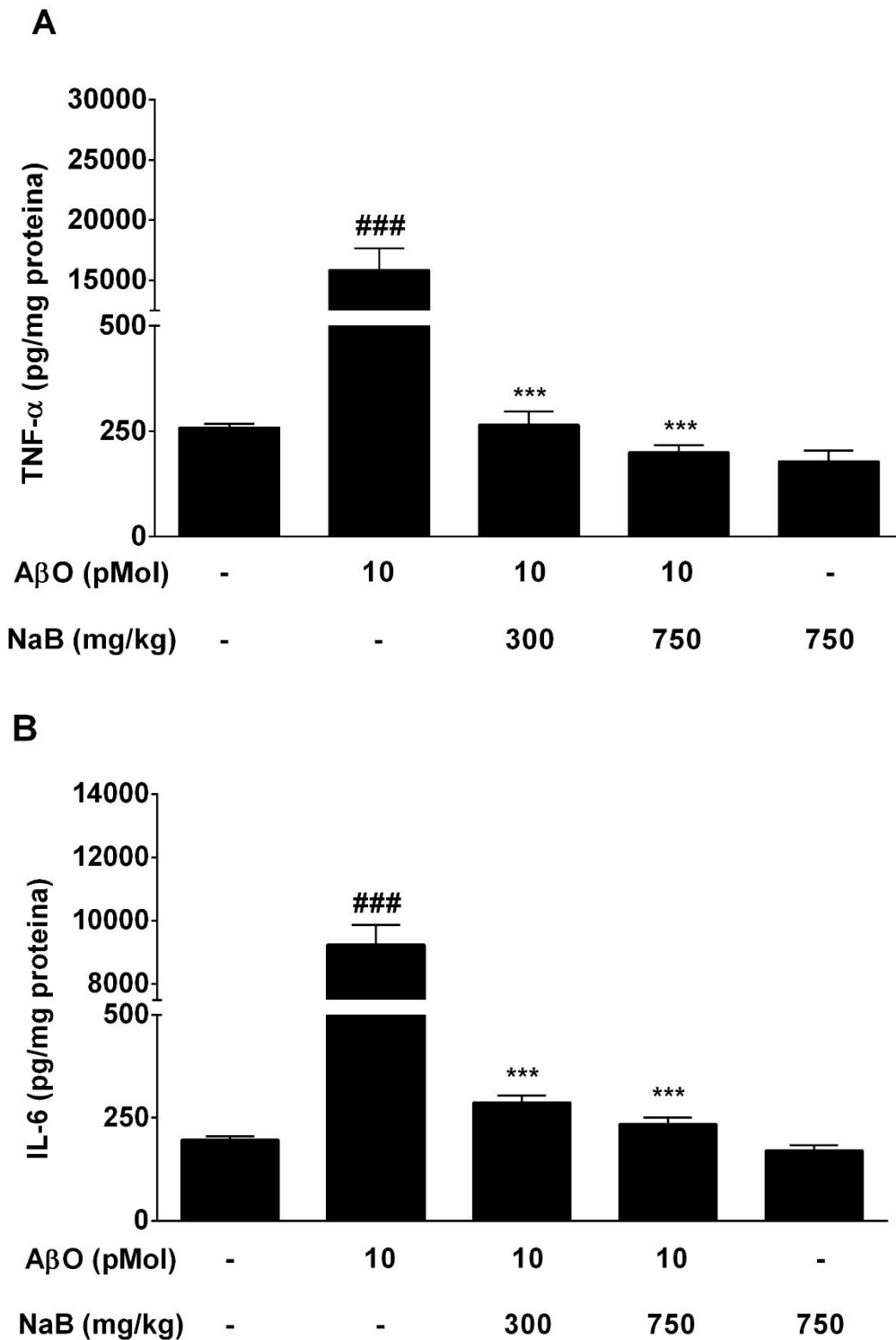


Figura 4.9. Efeito do tratamento com NaB sobre o perfil de citocinas pró-inflamatórias no córtex pré-frontal. Os animais foram tratados com NaB (300 mg/Kg ou 750 mg/Kg) ou salina por 8 dias via IP. Vinte e quatro horas após o início do tratamento com NaB os animais receberam uma injeção icv de AβOs (10 picomol) ou veículo. Após a realização dos testes comportamentais o córtex pré-frontal dos animais foi coletado e processado conforme descrito na metodologia e os níveis de TNF-α (A) e IL-6 (B) foram analisados por ELISA. As colunas indicam média ± erro padrão da média, n=8-10 animais em cada grupo experimental, um experimento independente (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, ***p<0,001, para diferença significativa em relação ao grupo injetado com AβOs; ###p<0,001, para diferença significativa em relação ao grupo controle).

Os níveis de IL-10 foram avaliados no córtex pré-frontal dos animais (Figura 4.10). Surpreendentemente, apenas o grupo injetado com A β Os e tratado com 300 mg/Kg de NaB apresentou um aumento significativo nos níveis dessa citocina quando comparado ao grupo injetado com A β Os. O grupo injetado com A β Os e o grupo que foi injetado com A β Os e tratado com 750 mg/Kg de NaB não apresentou alteração significativa nos níveis dessa citocina.

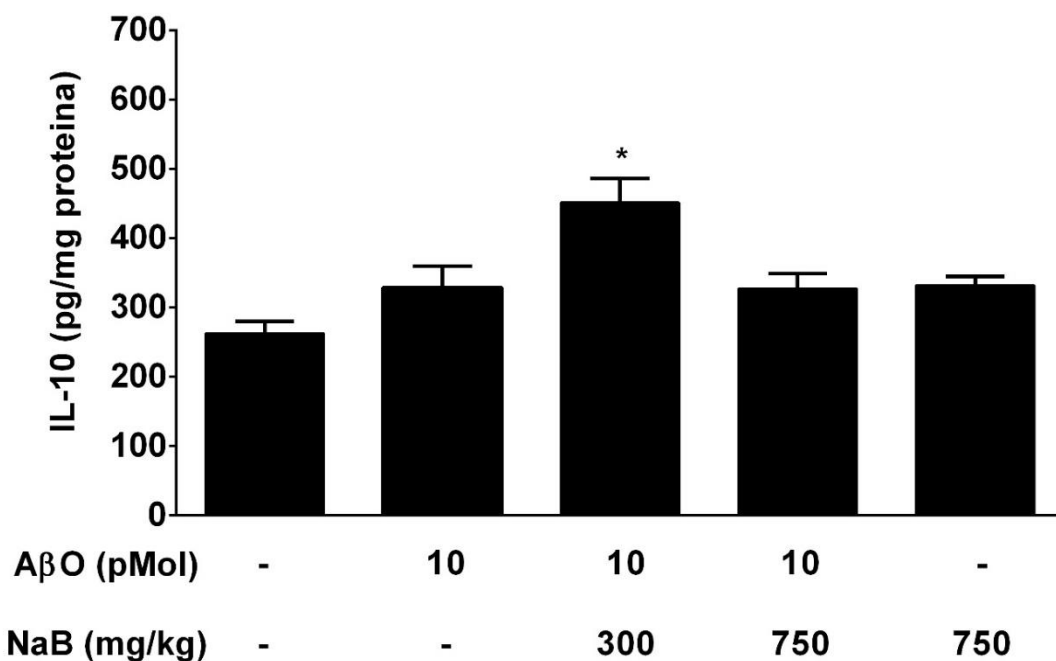


Figura 4.10 – Efeito do tratamento com NaB sobre o perfil da IL-10 no córtex pré-frontal. Os animais foram tratados com NaB (300 mg/Kg ou 750 mg/Kg) ou salina por 8 dias via IP. Vinte e quatro horas após o início do tratamento com NaB os animais receberam uma injeção icv de A β Os (10 picomol) ou veículo. Os níveis de IL-10 foram analisados por ELISA no córtex dos animais 8 dias após o início do tratamento. As colunas indicam média \pm erro padrão da média, n=9-10 animais em cada grupo experimental, um experimento independente (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, *p<0,05; para diferença significativa em relação ao injetado com A β Os).

Como pode ser observado na figura 4.11, apenas o grupo injetado com A β Os apresentou níveis significativos TNF- α (A) e IL-6 (B) no soro. Os grupos controle e tratados com NaB, com e sem a injeção de A β Os, não apresentaram níveis detectáveis dessas citocinas.

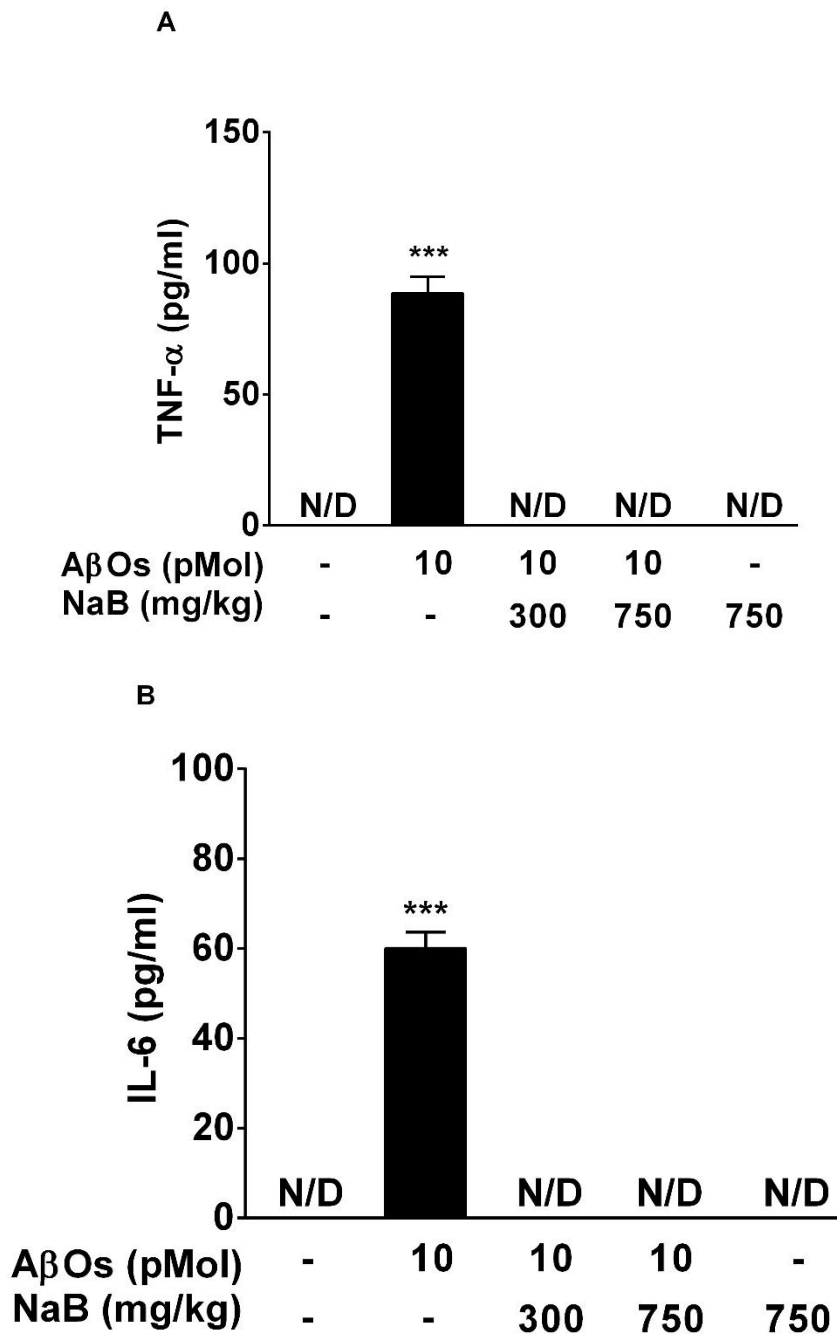


Figura 4.11. Efeito do tratamento com NaB sobre o perfil de citocinas pró-inflamatórias no soro. Os animais foram tratados com NaB (300 mg/Kg ou 750 mg/Kg) ou salina por 8 dias via IP. Vinte e quatro horas após o início do tratamento com NaB os animais receberam uma injeção icv de A β Os (10 picomol) ou veículo. Os níveis de TNF- α (A) e IL-6 (B) foram analisados por ELISA no soro dos animais 8 dias após o início do tratamento. As colunas indicam média \pm erro padrão da média, n=5 animais em cada grupo experimental. N/D= não detectável.

Em seguida, com o objetivo de investigar as possíveis vias de sinalização celular envolvidas no efeito neuroprotetor do NaB em um modelo *in vivo* de toxicidade

induzida pelos A β Os, foram avaliadas a fosforilação/ativação de proteínas da via das MAPK como a JNK, p38 e ERK por *Western blotting*. Na figura 4.12, observamos que os grupos injetados com A β Os apresentaram um aumento significativo na fosforilação/ativação da ERK (A), JNK (B) e p38 (C) em relação ao grupo controle. Os grupos injetados com A β Os e tratados com NaB, em ambas as doses administradas, não apresentaram esse efeito, tendo resultado comparável ao grupo controle. Além disso, observamos que o tratamento com NaB sem a injeção de A β Os não promoveu alteração significativa na fosforilação/ativação dessas vias de sinalização quando comparado ao grupo controle.

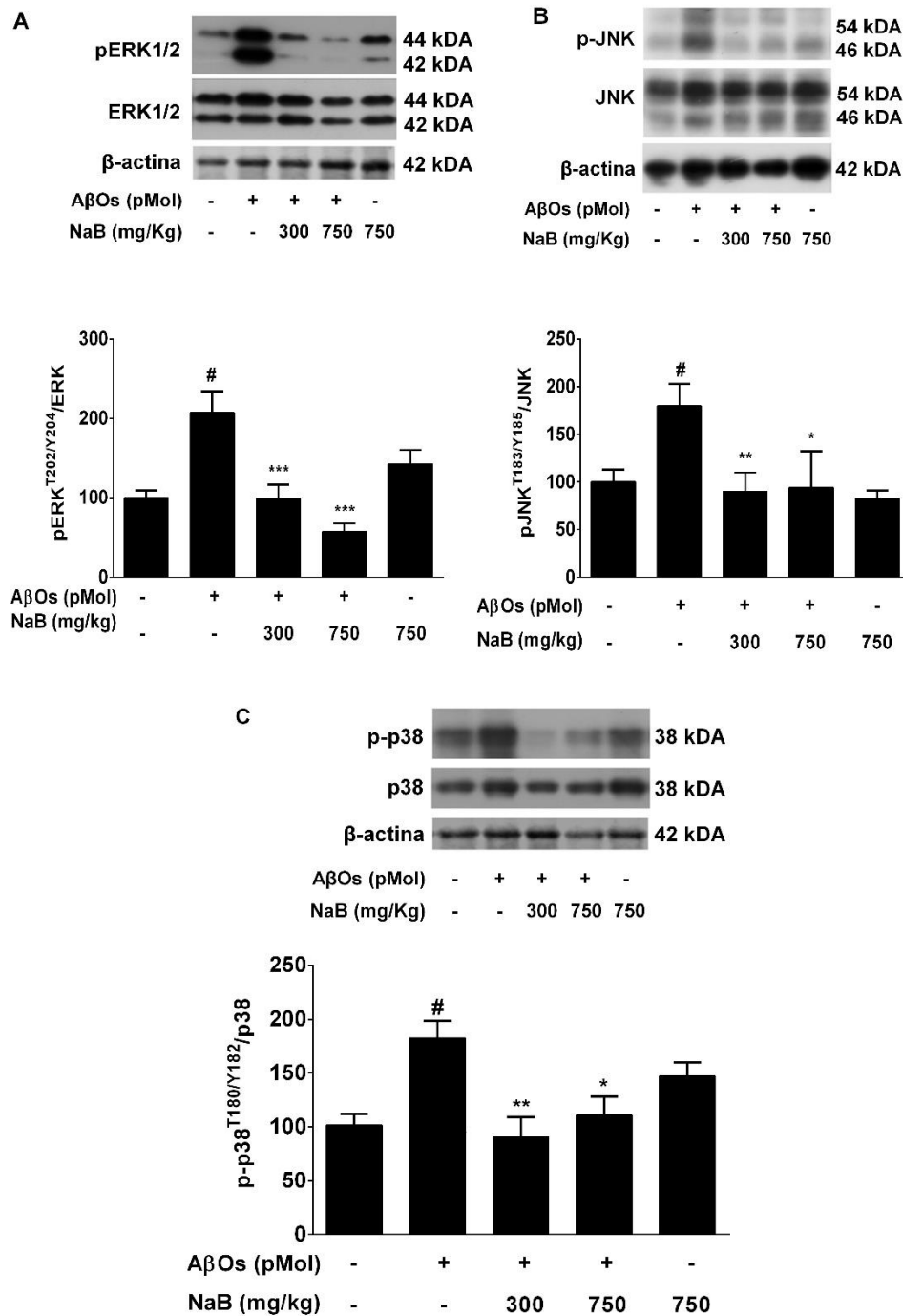


Figura 4.12. Efeito do tratamento com butirato de sódio sobre a via das MAPKs. Os animais foram tratados com NaB (300 mg/Kg ou 750 mg/Kg) ou salina por 8 dias via IP. Vinte e quatro horas após o início do tratamento com NaB os animais receberam uma injeção icv de AβOs (10 picomol) ou veículo. Após a realização dos testes comportamentais os hipocampus foram coletados e processados conforme descrito na metodologia e o imunoc conteúdo das formas fosforiladas e total das proteínas ERK (A), JNK (B) e p38 (C) foi detectado no hipocampo através de *Western blotting* usando anticorpos específicos. Imagem representativa do imunoc conteúdo e quantificação mostrando a relação pERK/ERK (A), pJNK/JNK (B) e p-p38/p38 (C). As colunas indicam média ± erro padrão da média, n=8-14 (A), n=6-9 (B) e n=9-14 (C) animais em cada grupo experimental (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, para diferença significativa em relação ao grupo somente injetado com AβOs; #p<0,05 para diferença significativa em relação ao grupo controle).

Na sequência, foi avaliada a expressão da proteína GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), um conhecido marcador de astrócitos ativados, por *Western blotting* (73). Como pode ser observado na figura 4.13, o grupo que recebeu somente a injeção com A β Os apresentou um aumento significativo no imunocontéudo de GFAP. Já os grupos injetados com A β Os que receberam o tratamento com NaB, em ambas as doses administradas, não apresentaram esse efeito. Além disso, observamos que o grupo que recebeu NaB sem a injeção de A β Os não apresentou diferença significativa no imunocontéudo de GFAP em relação ao grupo controle.

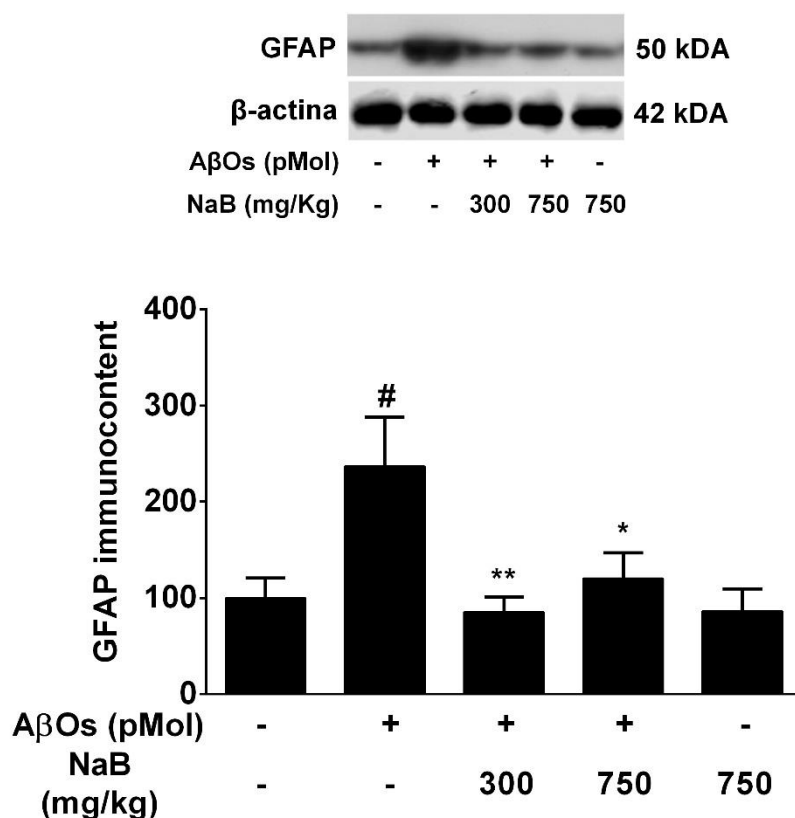


Figura 4.13. Efeito do tratamento com butirato de sódio sobre o imunocontéudo da GFAP. Os animais foram tratados com NaB (300 mg/Kg ou 750 mg/Kg) ou salina por 8 dias via IP. Vinte e quatro horas após o início do tratamento com NaB os animais receberam uma injeção icv de A β Os (10 picomol) ou veículo. Após a realização dos testes comportamentais os hipocampos foram coletados e processados conforme descrito na metodologia e o imunocontéudo de GFAP foi detectado através de *Western blotting* usando anticorpos específicos. Imagem representativa do imunocontéudo e quantificação mostrando a relação GFAP/ β -actina. As colunas indicam média \pm erro padrão da média, n=5-9 animais em cada grupo experimental (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, *p<0,05; **p< 0,01; para diferença significativa em relação ao grupo somente injetado com A β Os; #p<0,05 para diferença significativa em relação ao grupo controle).

5. DISCUSSÃO

O aumento na prevalência da DA em decorrência do aumento da expectativa de vida no Brasil e no mundo aponta para essa doença como um potencial problema de saúde pública devido ao elevado impacto nos gastos do sistema público. Além disso, a DA é uma doença com tratamento sintomático e não há ainda opção terapêutica capaz de interromper a progressão da doença. Assim, há uma busca constante por novos compostos com possibilidade terapêutica que possam modular a neurodegeneração e a progressão da DA. Dessa forma, a pesquisa básica utiliza tanto modelos *in vitro* como *in vivo* para estudos que buscam o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos capazes de detectar estágios iniciais da DA, bem como de novas estratégias terapêuticas. Assim, o objetivo central desta dissertação foi avaliar o possível efeito neuroprotetor do NaB em modelo experimental da DA através da exposição de culturas organotípica de hipocampo de ratos aos A β O s e da injeção icv dos A β O s em camundongos. Nossos resultados demonstraram que a preparação de A β O s apresentava uma mistura de oligômeros de baixo e alto peso molecular, praticamente desprovida de monômeros, o que está de acordo com a tendência do A β ₁₋₄₂ de auto-agregação em meio aquoso. Por serem metaestáveis, as preparações de A β O s são rotineiramente analisadas, em colaboração com o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas da UFRJ, por cromatografia de gel-filtração (138). Na cultura organotípica o tratamento com NaB aumentou de forma significativa a acetilação de histonas (H2b e H3) frente à toxicidade dos A β O s . Em modelo *in vivo* de toxicidade induzida pelos A β O s , o tratamento impediu os danos cognitivos e o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias promovidos pelos A β O s . Além disso, o tratamento bloqueou a ativação de vias de sinalização como a JNK, p38 e ERK, bem como a astrogliose reativa.

O modelo de cultura organotípica foi utilizado nesse trabalho por apresentar algumas vantagens sobre a cultura de células isoladas. Esse modelo permite a manutenção das características estruturais, mantendo todos os tipos celulares encontrados no tecido, bem como a organização sináptica, possibilitando, por exemplo, o estudo de mediadores inflamatórios ou de compostos farmacológicos que possam interferir na sobrevivência celular (139,148). Para avaliar a viabilidade celular da cultura organotípica realizamos a marcação com IP. A baixa incorporação de IP nos grupos tratados com NaB demonstrou que o tratamento não foi tóxico às células. Além disso, a exposição da cultura aos A β O s não levou à morte celular, uma vez que,

como relatado na literatura, em estágios iniciais da DA, os A β Os causam toxicidade sináptica (51), mas não desencadeiam morte por necrose (principal forma de morte celular detectada com IP). Esse resultado foi também observado no trabalho de Maneghetti (2014) quando da exposição da cultura organotípica à concentrações de 0,5 a 2 μ M de A β Os por um período de 48h (149). A fim de comprovar que a baixa incorporação de IP nos grupos expostos aos A β Os e tratados com NaB não era decorrente de uma falha no mecanismo de ação do IP, realizamos a exposição de um grupo ao glutamato como controle positivo. Esse grupo apresentou elevada incorporação de IP, confirmando a viabilidade do composto empregado no experimento.

O tratamento com NaB na cultura organotípica promoveu um aumento significativo na acetilação das histonas H2B e H3 em relação ao grupo exposto somente aos A β Os. Esse resultado foi também observado em modelo animal transgênico (APP/PS1) tratado com NaB (134). Além disso, observamos que o grupo exposto aos A β Os não apresentou alteração significativa na acetilação de ambas as histonas avaliadas em relação ao grupo controle. De forma contrária, em modelo animal transgênico (APP/PS1 e Tg2576), foi observado uma diminuição na acetilação de histonas nos animais transgênicos em relação aos animais selvagens (134,150). Esses resultados podem estar relacionados ao tipo de modelo estudado. Os animais transgênicos mimetizam a DA de origem familiar, a qual representa apenas 5% do total dos casos (7,11). No modelo animal transgênico há a formação das placas senis e as análises foram realizadas em animais de 9 e 15 meses de idade. Enquanto que, em nosso modelo, foi avaliado o efeito dos A β Os, os quais estão mais relacionados aos estágios iniciais da DA, na cultura organotípica de animais de 6 a 8 dias de vida.

Com o objetivo de compreender os mecanismos de toxicidade induzidos pelo A β Os em modelo *in vivo* foi realizada uma injeção icv de A β Os em camundongos. A utilização da injeção icv de A β OS é um modelo de estudo alternativo ao uso de animais transgênicos e adequado para investigar mecanismos moleculares e alterações cognitivas relacionados à DA, bem como no desenvolvimento e avaliação de novas abordagens terapêuticas (151).

A presença dos A β Os em regiões do cérebro relacionadas às funções cognitivas, como o hipocampo e o córtex pré-frontal, correlaciona-se às alterações presentes na DA, bem como alterações moleculares que levam à perda na viabilidade sináptica e morte neuronal (44,138,152). Nossos resultados indicaram que uma única injeção icv de A β Os promoveu danos na memória de curta e longa duração dos animais conforme

demonstrado no teste de RO e de medo condicionado ao contexto. O teste de RO foi realizado em dois momentos diferentes para verificar se os danos observados 24 horas após a injeção persistiam 5 dias após a injeção dos A β Os. Em concordância com nosso resultado, o trabalho de Figueiredo *et al.* (2013) demonstrou que os danos na memória persistem por mais de duas semanas após uma única injeção de A β Os (138). O tratamento dos animais que receberam a injeção de A β Os com NaB foi capaz bloquear os danos na memória de curta e longa duração frente à toxicidade dos A β Os. No trabalho de Govindarajan *et al.* (2012), animais transgênicos (APP/PS1) de 8 meses de idade foram avaliados no experimento de medo condicionado ao contexto e o resultado revelou que esses animais apresentavam danos na memória de longa duração. Em seguida, os animais transgênicos (APP/PS1) foram geneticamente modificados para não expressar a enzima HDAC e reavaliados no teste de medo condicionado ao contexto. O resultado demonstrou que os animais sem HDAC não apresentavam danos na memória de longa duração, tendo níveis de *freezing* semelhantes aos animais controle (153). Apesar da melhora cognitiva, não havia alteração no tamanho das placas senis dos animais. Outros estudos já demonstraram que a ausência de HDAC 2 (129) e HDAC 3 (154) pode melhorar a memória e a plasticidade sináptica, sendo esse efeito independente de alterações no tamanho das placas senis (155). Esses resultados reforçam o papel dos A β Os na disfunção sináptica nos estágios iniciais da DA, o qual é mimetizado em nosso modelo. Essa hipótese foi reforçada no trabalho de Fischer *et al.* (2007) onde o tratamento com NaB promoveu aumento no número de sinapses e reestabeleceu o aprendizado em modelo animal transgênico (CK-p25) que apresenta aumento na atividade de HDAC 2 (90). Conjuntamente, nossos resultados demonstram que o tratamento com NaB exerce efeitos benéficos sobre a memória de curta e longa duração frente a toxicidade induzida por A β Os. Considerando o aumento de H2B e H3 observado no modelo de cultura organotípica, esses resultados sobre a melhora cognitiva podem estar associados ao aumento na acetilação de histonas através do bloqueio da enzima HDAC.

Os níveis de IL-6 e TNF- α foram avaliados no córtex pré-frontal dos animais, uma vez que essa é uma das regiões do cérebro envolvida com as alterações de memória observadas no teste de reconhecimento de objetos sendo especialmente vulnerável às consequências da neuroinflamação (156,157). Uma das evidências de que a presença de citocinas pró-inflamatórias promove a neurodegeneração na DA é a elevada concentração desses mediadores no cérebro de pacientes com essa

doença quando comparado ao cérebro de indivíduos saudáveis (158,159). Além disso, pacientes com DA apresentam níveis elevados de IL-6 e TNF- α no plasma (160), o qual foi também observado em nossos animais. Empregando uma análise de regressão logística múltipla foi demonstrado que níveis elevados de TNF- α no plasma correlacionam-se à maior probabilidade de desenvolver DA (160). O trabalho de Yaffe *et al.* (2003) sugeriu que níveis sistêmicos elevados de citocinas pró-inflamatórias podem estar relacionados à danos cognitivos, corroborando com os resultados obtidos em nosso modelo de toxicidade induzida por A β Os (161). Dessa forma, duas teorias foram postuladas. A primeira sugere que uma produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias no cérebro poderia contribuir para o aumento nos níveis sistêmicos dessas citocinas. A segunda infere que citocinas periféricas poderiam atravessar a BBB e interferir nas funções cerebrais (162,163). Esse ambiente inflamatório correlaciona-se com uma redução na capacidade de fagocitose da microglia, propiciando o acúmulo do A β , a conseqüente formação das placas senis (71) e progressão da DA. Além disso, pode haver uma alteração na produção de mediadores neurotróficos essenciais na manutenção da plasticidade neural correlacionando-se com os danos cognitivos observados na DA, que também foram observados em nosso modelo (164). A diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias pelo tratamento com NaB em nosso modelo é corroborado pelo trabalho conduzido por Huuskonen *et al.* (2004). Os autores trataram com NaB uma cultura de microglia exposta à lipopolissacarídeo (LPS) e observaram que o tratamento também diminuiu os níveis de TNF- α e IL-6, confirmando o efeito anti-inflamatório do NaB, bem como impediu a ativação de NF- κ B (165). Em nosso estudo, a pronunciada diminuição de TNF- α observada nos animais tratados com NaB conjuntamente com nosso resultado de aumento de acetilação de histonas na cultura organotípica corrobora para a hipótese que o mecanismo pelo qual o NaB exerce papel anti-inflamatório pode estar relacionado ao bloqueio da enzima HDAC. O aumento na acetilação de histonas poderia promover a redução na transcrição de TNF- α através do bloqueio da iniciação da transcrição. Contudo, esse mecanismo de supressão da transcrição de TNF- α em resposta ao aumento na acetilação de histonas ainda precisa ser elucidado (117). Adicionalmente o mecanismo pelo qual o NaB promove seu efeito anti-inflamatório pode estar ainda relacionado ao bloqueio da ativação do NF κ B, um fator de transcrição que controla a expressão de citocinas pró-inflamatórias, através do bloqueio de HDAC (166,167). Em um estudo com pacientes portadores de retocolite ulcerativa, os elevados níveis de NF κ B foram reduzidos pelo tratamento com NaB e esse efeito

correlacionava-se com uma diminuição no número de neutrófilos e linfócitos infiltrados (168). A diminuição de TNF- α nos animais tratados com NaB conjuntamente com a melhora cognitiva observada nesses animais frente à toxicidade promovida pela injeção de A β Os está em concordância com a melhora cognitiva observada em testes cognitivos de pacientes com DA moderada a grave que foram tratados com uma proteína recombinante que interfere na atividade do TNF- α (169). Assim, o tratamento com NaB frente à toxicidade induzida por A β Os promoveu melhora cognitiva através de seu efeito anti-inflamatório, com a diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Análises *in vivo* da acetilação de histonas são necessárias para confirmar se o aumento da acetilação de histonas pelo bloqueio da enzima HDAC tem relação com o efeito anti-inflamatório do NaB.

O bloqueio do aumento nos níveis TNF- α e IL-6 foi acompanhado de um aumento nos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, no córtex pré-frontal dos animais tratados com NaB. Surpreendentemente, a maior dose de NaB administrada não alterou os níveis de IL-10. Esse resultado pode estar relacionado ao tempo entre o início do tratamento com NaB, a injeção dos A β Os e a dosagem de IL-10. A maior dose de NaB poderia ter promovido uma produção precoce de IL-10, o qual não era mais detectável no momento da dosagem. O aumento nos níveis de IL-10 poderia impedir a produção de citocinas pró-inflamatórias, um efeito benéfico ao equilíbrio da resposta inflamatória frente a toxicidade dos A β Os (47). Além disso, esse aumento proporciona uma melhora na capacidade de fagocitose da microglia contribuindo para a remoção do A β (71).

A presença de citocinas pró-inflamatórias promove a ativação de vias de sinalização como a JNK, p38 e ERK, cuja ativação correlaciona-se com a progressão da DA (35,54). De modo semelhante ao nosso modelo, diferentes modelos de estudo utilizando cultura organotípica de hipocampo (170) e cultura de microglia (171) e de neurônios (51), observaram um aumento da ativação da JNK (51,172) da ERK (170) e da p38 (171,172) frente à toxicidade do A β . Esse aumento poderia estar comprometendo a sinalização da via e levando aos danos cognitivos observados nos animais. Em modelo animal transgênico, utilizando camundongos Tg2576 que superexpressam a APP e apresentam a formação de placas senis (173), foi observado um aumento na ativação dessas vias adjacente às placas senis (34,172), como também no cérebro de pacientes com DA a ativação dessas vias já foi demonstrada (52,53,174). O papel da via das MAPKs na DA pode estar relacionado à mudanças no metabolismo da APP, uma vez que essas vias regulam a atividade das enzimas β e

γ -secretase, propiciando o processamento da APP pela via amiloidogênica, gerando mais A β Os e a consequente ativação das células da glia, contribuindo para a neuroinflamação e para o comprometimento cognitivo (37,172,175). Além disso, a ativação das MAPKs está relacionada à hiperfosforilação da tau, comprometendo o transporte axonal, e também à perda na viabilidade sináptica, caracterizada pela redução nos níveis de sinaptofisina, o que pode estar correlacionado aos danos cognitivos observados na DA e que também foram observados em nosso modelo (17,172,175). Esses eventos podem gerar uma alça de retroalimentação positiva sinalizando para a ativação da via, propiciando a cronicidade da inflamação, danos cognitivos e a progressão da DA. Em nosso estudo, o aumento da ativação das MAPKs frente à toxicidade dos A β Os foi bloqueado pelo tratamento com NaB que também foi capaz de impedir o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, frente à toxicidade dos A β Os, contribuindo para a melhora cognitiva observada. Esse resultado é reforçado pelo trabalho de Rowan (2004) onde a administração de um inibidor não seletivo das MAPKs impediu o A β de inibir a LTP, um dos mecanismos essenciais no aprendizado e na formação da memória (152,176). De modo específico, já foi demonstrado que a inibição da via da JNK e da ERK reduzem a toxicidade induzida pelo A β , revertendo danos na memória em modelo animal de DA (55,172). Além disso, em animais geneticamente modificados que não expressam a proteína cinase ativada por mitógeno ou estresse 1 (MSK1 - mitogen- and stress-activated protein kinase-1), a qual faz parte da cascata de sinalização da ERK, foram observados danos cognitivos e hipoacetilação de histonas (177). Considerando que o comprometimento da via da ERK correlaciona-se com uma hipoacetilação de histonas e que na cultura organotípica o tratamento com NaB promoveu um aumento na acetilação de histonas, esse efeito poderia também estar contribuindo para a melhora cognitiva observada nos animais (177). Embora análises *in vivo* da acetilação de histonas sejam necessárias para confirmar esse efeito, essa hipótese é reforçada por estudos onde o tratamento com inibidores da HDAC promoveram um aumento na acetilação de histonas acompanhada de melhora na memória e plasticidade sináptica (90,115). Conjuntamente nossos resultados indicam que o NaB poderia assumir um papel estratégico no estudo de novas opções terapêuticas para a DA uma vez que o tratamento promoveu aumento na acetilação de histonas na cultura organotípica, possivelmente pela inibição da HDAC, e, em modelo *in vivo*, a modulação da ativação da via das MAPKs e efeito anti-inflamatório, com a diminuição dos níveis de citocinas

pró-inflamatórias, contribuindo para a melhora cognitiva frente à toxicidade induzida por A β Os.

Astrócitos ativados em resposta a danos cerebrais tem como característica um aumento na expressão da proteína GFAP (47,58). Na DA, esse aumento ocorre mesmo antes da formação das placas senis (178). Nossos resultados demonstraram que animais injetados somente com A β Os apresentavam um aumento significativo no imunocontéudo dessa proteína, indicando ativação astrocitária. A ativação astrocitária já foi observada em cultura de astrócitos expostos à A β Os e em modelo animal transgênico (Tg2576) (48,179). Ainda que inicialmente os astrócitos atuem promovendo a remoção do A β , a ativação crônica dessas células leva ao agravamento da neurodegeneração (59). Em nosso estudo, os animais tratados com NaB não apresentaram alteração significativa no imunocontéudo de GFAP em relação ao grupo controle. Em concordância com esse resultado, em cultura de astrócitos exposta aos A β Os, o uso de minociclina impediu a ativação dos astrócitos e a liberação de IL-1 β e IL-6, citocinas pró-inflamatórias, (48). Além disso, em modelo animal transgênico (Tg2576) o tratamento dos animais com ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteroide, impediu o aumento no imunocontéudo de GFAP (179). Considerando a modulação da ativação dos astrócitos e o bloqueio no aumento dos níveis de IL-6 e TNF- α , conjuntamente esses resultados indicam que o tratamento com NaB apresentou efeito anti-inflamatório frente à toxicidade dos A β Os. Ainda, uma vez que a ativação crônica das células da glia e a produção de citocinas pró-inflamatórias está correlacionado com a perda sináptica e com as alterações cognitivas observadas em modelo animal e em pacientes com DA, os resultados obtidos com o tratamento com NaB indicam que essa droga poderia ser estratégica para estudos sobre o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a DA (58,59,73).

6. CONCLUSÃO

Nessa dissertação foram avaliados os efeitos do tratamento com NaB em cultura organotípica de hipocampo exposta à A β Os e em modelo *in vivo* de toxicidade induzida por A β Os. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com NaB promoveu:

- aumento na acetilação das histonas H2B e H3 em modelo de cultura organotípica de hipocampo de ratos exposta à A β Os;
- bloqueio das alterações na memória de curta e longa duração frente à toxicidade dos A β Os;
- bloqueio do aumento de TNF- α e IL-6 no córtex pré-frontal e no soro de animais injetados com A β Os;
- aumento nos níveis de IL-10 no córtex de animais injetados com A β Os;
- bloqueio da ativação/fosforilação das proteínas JNK, p38 e ERK induzida pelos A β Os.

REFERÊNCIAS

1. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):741–66.
2. Federal Interagency Forum on Aging Related Statistics. Older Americans 2004: Key Indicators of Well-Being. <http://www.agingstats.gov/chartbook2004/population.html>. Acesso em 13 de julho de 2017. Population. 2010;
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BR). Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período de 2000/2060. 2013;
4. Aprahamian I, Martinelli JE, Yassuda MS. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. 2009;7:27–35.
5. Plassman BL, Langa KM, Fischer GG, Heeringa SG, Weir DR, Ofstedal MB et al. Prevalence of Dementia in the United States: the Aging, demographics, and memory study. *Neuroepidemiology.* 2007;29(1–2):125–32.
6. Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2010;362:329–44.
7. Fridman C, Gregório SP, Neto ED, Ojopi EPB. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. *Rev Psiquiatr.* 2004;31(1):19–25.
8. Report S. 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures. 2015;
9. Burns A, Byrne EJ, Maurer K. Alzheimer's Disease. *Lancet.* 2002;360:1–2.
10. Ferreira ST, Klein WL. The Ab oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;96(4):529–43.
11. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004;430:631–9.
12. Goate A, Chartier-Harlin M, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Lett To Nat.* 1991;349:704–6.
13. Koo EH, Kopan R. Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nat Med.* 2004;S26–33.
14. Bettens K, K S, Broeckhoven CV. Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2013;12(1):92–104.
15. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Neurosci.* 2010;36(3):490–9.
16. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:101–12.

17. Iqbal K et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1739:198–210.
18. Barron M et al. A state of delirium: deciphering the effect of inflammation on tau pathology in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2016;
19. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120(3):885–90.
20. Lee Y, Han SB, Nam S, Oh K, Hong JT. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*. 2010;33(10):1539–56.
21. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease : the amyloid cascade hypothesis. *Science (80-)*. 1992;256:184–5.
22. Yankner BA, Dawes LR, Fischer S, Villa-Komaroff L, Oster-Grantie ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of APP associated with AD. *Science (80-)*. 1989;245:417–20.
23. Mucke L, Masliah E, Yu G, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*. 2000;20(11):4050–8.
24. Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, Demattos RB, Mathias C et al. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*. 2002;5(5):452–7.
25. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M et al. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2007;27(4):796–807.
26. Lambert MA, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6448–53.
27. Koistinaho M, Ort M, Cimadevilla JM, Vondrous R, Cordell B, Koistinaho J et al. Specific spatial learning deficits become severe with age in β -amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse β -amyloid deposits but do not form plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14675–80.
28. Lilja AM, Porras O, Storelli E, Nordberg A, Marutle A. Functional interactions of fibrillar and oligomeric amyloid- β with alpha7 nicotinic receptors in alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2011;23:335–47.
29. De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST et al. AB oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem*. 2007;282(15):11590–601.
30. Bu G, Cam J, Zerbinatti C. LRP in amyloid-B production and metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1086:35–53.

31. Patel AN, Jhamandas JH. Neuronal receptors as targets for the action of amyloid-beta protein (A β) in the brain. *Expert Rev Mol Med*. 2012;14.
32. Origila N, Arancio O, Domenici L, Yan SS. MAPK, b-amyloid and synaptic dysfunction: the role of RAGE. *Expert Rev*. 2009;9(11):1635–45.
33. De Felice FG, Vieira MNN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(6):1971–6.
34. Puig B, Gómez-Isla T, Ribé E, Cuadrado M, Torrejón-Escribano B, Dalfó E et al. Expression of stress-activated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and tau hyperphosphorylation in neurites surrounding A β plaques in APP Tg2576 mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004;30:491–502.
35. Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation : implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2009;34(1):4–20.
36. Benilova I, Karran E, Strooper BD. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*. 2012;15(3):349–57.
37. Kim EK, Choi E-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2010;1802:396–405.
38. Kim EK, Choi E. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol*. 2015;89(6):867–82.
39. Kim D, Chung J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol*. 2002;35(1):106–15.
40. De Ferrari GV, Chacón MA, Barría MI, Garrido JL, Godoy Ja, Olivares G et al. Activation of Wnt Signaling Rescues Neurodegeneration and Behavioral Impairments Induced by β -Amyloid Fibrils. *Mol Psychiatry*. 2003;8:195–208.
41. Reddy PH. Amyloid beta-induced glycogen synthase kinase 3B phosphorylated VDAC1 in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction and neuronal damage. *Biochim Biophys Acta*. 2014;6(244):1–16.
42. Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel J, Decker H et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1339–53.
43. Forny-Germano L, Silva NML, Batista AF, Brito-Moreira J, Gralle M, Boehnke SE et al. Alzheimer's Disease-Like Pathology Induced by Amyloid- Oligomers in Nonhuman Primates. *J Neurosci*. 2014;34(41):13629–43.
44. Ledo JH, Azevedo EP, Clarke JR, Ribeiro FC, Figueiredo CP, Foguel D et al. Amyloid- β oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. *Mol Psychiatry*. 2013;18:1053–4.

45. Lourenco MV, Clarke JR, Frozza RL, Bomfim TR, Forny-Germano L, Batista AF et al. TNF- α Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's β -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. *Cell Metab.* 2013;18:831–43.
46. Ledo JH, Azevedo EP, Beckman D, Ribeiro FC, Santos LE, Razolli DS, et al. Cross talk between brain innate immunity and serotonin signaling underlies depressive-like behavior induced by Alzheimer's amyloid-B oligomers in mice. *J Neurosci.* 2016;36(48):12106–16.
47. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000 Jun;21:383–421.
48. Garwood CJ, Pooler AM, Atherton J, Hanger DP, Noble W. Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. *Cell Death Dis.* 2011;2(6):1–9.
49. Meda L, Bernasconi S, Bonaiuto C, Sozzani S, D Z, Otvos L et al. Beta-amyloid (25-35) peptide and IFN-gamma synergistically induce the production of the chemotactic cytokine MCP-1/JE in monocytes and microglial cells. *J Immunol.* 1996;157:1213–8.
50. Clarke JR, Silva NML, Figueiredo CP, Frozza RL, Ledo JH, Beckman D et al. Alzheimer-associated AB oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Mol Med.* 2015 Feb 1;7(2):190–210.
51. Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barret T, Takano H, Flavell R et al. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci.* 2001;21(19):7551–60.
52. Hensley K, Floyd RA, Zheng N, Nael R, Robinson KA, Nguyen X et al. p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem.* 1999;72(5):2053–8.
53. Perry G, Roder H, Nunomura A, Takeda A, Friedlich AL, Zhu X et al. Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. *Neuroreport.* 1999;10:2411–5.
54. Eldik LJV, Thompson WL, Ranaivo HR, Behana HA, Watterson DM. Glia proinflammatory cytokine upregulation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases: function-based and target-based discovery approaches. *Int Rev Neurobiol.* 2007;82(7):277–96.
55. Feld M, Krawczyk MC, Fustiñana MS, Blake MG, Baratti CM, Romano A, et al. Decrease of ERK/MAPK overactivation in prefrontal cortex reverses early memory deficit in a mouse model of alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2014;40(1):69–82.
56. Shoji M, Iwakami N, Takeuchi S, Waragai M, Susuki M, Kanazawa I et al. JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;85:221–33.

57. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1387–94.
58. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FG. Review mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010;140:918–34.
59. Heneka MT, O’Bannon MK, Terwel D, Kummer MP. Neuroinflammatory processes in Alzheimer’s disease. *J Neural Transm.* 2010;117:919–47.
60. Cameron B, Landreth GE. Inflammation, microglia, and alzheimer’s disease. *Neurobiol Dis.* 2010;37(3):503–9.
61. Fassbender K, Walter S, Kühl S, Landman R, Ishii K, Bertsch T et al. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer’s disease. *FASEB J.* 2003;18:203–5.
62. Liu Y, Walter S, Stagi M, Cherny D, Letiembre M, Schulz-schaeffer W et al. LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer’s amyloid peptide. 2005;128:1778–89.
63. Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A et al. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. 2009;30:759–68.
64. Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Hao W, Bode B et al. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer’s Disease. 2007;20.
65. Reed-geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β - stimulated microglial activation. *Neuroscience.* 2009;29(38):11982–92.
66. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E et al. TREM2 Variants in Alzheimer’s Disease. *N Engl J Med.* 2013;368(2):117–27.
67. Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML et al. TREM2 lipid sensing sustains microglia response in an Alzheimer’s disease model. *Cell.* 2015;160(6):1061–71.
68. KI A, Bachstetter AD, Colonna M, Ginhoux F, Holmes C, Lamb B et al. Targeting innate immunity for neurodegenerative disorders of the central nervous system. *J Neurochem.* 2016;138:653–93.
69. Colangelo AM, Alberghina L, Papa M. Astroglia as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett.* 2014;565:59–64.
70. Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* 2009;108:1343–59.
71. Landreth GE, Reed-Geaghan EG. Chapter 8. TLRs in Alzheimer’s Disease. Kielian T, editor. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. 1-14 p. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 336).

72. Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein S. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: Their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*. 2002;40:195–205.
73. Aiko Ishiki, Kamada M, Kawamura Y, Terao C, Shimoda F, Tomita N et al. Glial fibrillar acidic protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and frontotemporal lobar degeneration. *J Neurochem*. 2016;136:258–61.
74. Salvato F, Labate CA., Epigenética. Universidade de São Paulo. Seminário em genética e melhoramento de plantas. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lgn/pub/seminar/FSalvato-200702-Resumo.pdf>. Acesso em 05 de novembro de 2017.
75. Hemocentro de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Casa da Ciência. Mecanismos epigenéticos. Disponível em: <http://ead.hemocentro.fmrp.usp.br/joomla/index.php/noticias/adotepauta/669-mecanismos-epigeneticos>. Acesso em 05 de novembro de 2017. 2011;
76. Levenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:108–18.
77. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas - UFMG. Histonas. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupog/subdir/cromossomos.html> Histonas. Acesso em 5 de novembro de 2017.
78. Abel T, Zukin RS. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders *Ted*. 2008;57–64.
79. Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9447–52.
80. Cuadrado-Tejedor M, Garcia-Barroso C, Sanchez-Arias J, Mederos S, Rabal O, Ugarte A et al. Concomitant histone deacetylase and phosphodiesterase 5 inhibition synergistically prevents the disruption in synaptic plasticity and it reverses cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Clin Epigenetics*. 2015;7:108.
81. Gräff J, Tsai L-H. The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:311–30.
82. Broide RS, Redwine JM, Aftahi N, Young W, Bloom FE, Winrow CJ. Distribution of Histone Deacetylases 1–11 in the Rat Brain. *J Mol Neurosci*. 2007;31(3):281–7.
83. Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40545–59.
84. English JD, Sweatt JD. A requirement for the mitogenactivated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem*. 1997;19103–

- 19106 (1997).
85. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986;774–776 (1986).
 86. Harris EW, Ganong AH, Cotman CW. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N -methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res*. 1984;132–137.
 87. Gräff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai L. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev*. 2011;91:603–49.
 88. Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler J, Boutillier A. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J*. 2003;22(24):6537–49.
 89. Gräff J, Rei D, Guan J, Wang W, Seo J, Hennig KM. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*. 2015;483:222–6.
 90. Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai L. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*. 2007;447:178–83.
 91. Fischer A, Sananbenesi F, Mungenast A, Tsai L. Targeting the correct HDAC (s) to treat cognitive disorders. *Cell*. 2010;31(12):605–17.
 92. Volmar C, Wahlestedt C. Neuroepigenetics Histone deacetylases (HDACs) and brain function. *NEPIG*. 2015;1:20–7.
 93. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement*. 2011;7(3):280–92.
 94. Schneider LS et al. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer’s disease: An appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med*. 2014;275(3):251–83.
 95. Catalano SM, Dodson EC, Henze DA, Joyce JG, Krafft GA, Kinney GG. The role of amyloid-beta derived diffusible ligands (ADDLs) in Alzheimer’s disease. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(6):597–608.
 96. Nitrini R, Caramelli P, Bottino CMC, Damasceno BP, Brucki SMD, Anghinah R. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer: Recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Dement e Neuropsychol*. 2011;5(3):146–52.
 97. Cummings J, Aisen PS, Dubois B, Frölich L, Jack CR, Jones RW et al. Drug development in Alzheimer’s disease: the path to 2025. *Alzheimers Res Ther*. 2016;8(1):39.

98. Blennow K. A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Moving from CSF to Blood. *Neurology and Therapy*. 2017.
99. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. Vol. 12, *Alzheimer's and Dementia*. 2016. 292-323 p.
100. Viola KL, Klein WL. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathologica*. 2015.
101. Andreasson U, Blennow K, Zetterberg H. Update on ultrasensitive technologies to facilitate research on blood biomarkers for central nervous system disorders. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*. 2016.
102. O'Bryant SE, Gupta V, Henriksen K, Edwards M, Jeromin A, Lista S, et al. Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research. *Alzheimer's Dement*. 2015;
103. Inouye K, Oliveira GH. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para doença de Alzheimer. *Infarma*. 2004;15:80–4.
104. Forlenza OV. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Rev Psiquiatr Clín*. 2005;32:137–48.
105. De Falco A, Cukierman DS, Hauser-Davis RA, Rey NA. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Quim Nov*. 2016;39(1):63–80.
106. Hendrix JA, Bateman RJ, Brashear HR, Duggan C, Carrillo MC, Bain LJ et al. Challenges, solutions, and recommendations for Alzheimer's disease combination therapy. *Alzheimer's Dement*. 2016;12(5):623–30.
107. Prasad KN. Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions. *Life Sci*. 1980;27:1351–8.
108. Stilling RM, Wouw MV, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochem Int*. 2016;99:110–32.
109. Peters SG, Pomare EW, Fischer CA. Portal and peripheral blood short chain fatty acid concentrations after caecal lactulose instillation at surgery. *Gut*. 1992;(33):1249–52.
110. Canani, RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2011;17(12):1519–28.
111. Egorin MJ, Yuan Z, Sentz DL, Eiseman JL. Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. 1999;445–53.
112. Steliou K, Boosalis MS, Perrine SP, Sangerman J, Faller D. Butyrate histone deacetylase inhibitors. *Biores Open Access*. 2012;1(4):192–8.

113. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y et al. Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2004;13(11):1183–92.
114. Kim SW, Hooker JM, Otto N, Win K, Muench L, Shea C, et al. Whole-body pharmacokinetics of HDAC inhibitor drugs, butyric acid, valproic acid and 4-phenylbutyric acid measured with carbon-11 labeled analogs by PET. *Nucl Med Biol.* 2013;40(7):912–8.
115. Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweat JD et al. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuropsychopharmacology.* 2009;35:870–80.
116. Bourassa MW, Alim I, Bultman SJ, Ratan RR. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neurosci Lett.* 2016;625:56–63.
117. Zhang H, Du M, Yang Q, Zhu M. Butyrate suppresses murine mast cell proliferation and cytokine production through inhibiting histone deacetylase. *J Nutr Biochem.* 2016;27:299–306.
118. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes.* 2009;58.
119. Cummings H, Englyst HN. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *Am J Clin Nutr.* 1995;938S–945S.
120. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol Endocrinol.* 2014;28(8):1221–38.
121. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D et al. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11312–9.
122. Xiong Y, Miyamoto N, Shibata K, Valasek MA, Motoike T, Kedzierski RM et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(4):1045–50.
123. Nakao S, Fujii A, Niederman R. Alteration of cytoplasmic Ca²⁺ in resting and stimulated human neutrophils by short-chain carboxylic acids at neutral pH. *Infect Immun.* 1992;60(12):5307–11.
124. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(11):735–42.
125. Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and

- suckling rats. *Am J Physiol.* 1997;273:207–13.
126. Vijay N, Morris ME. Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain. *Curr Pharm Des.* 2014;20(10):1487–98.
 127. Moreira TJTO et al. Enhanced Cerebral Expression of MCT1 and MCT2 in a Rat Ischemia Model Occurs in Activated Microglial Cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(7):1273–83.
 128. Bahari-Javan S, Sananbenesi F, Fischer A. Histone-acetylation: a link between Alzheimer's disease and post-traumatic stress disorder? *Front Neurosci.* 2014;8:1–7.
 129. Guan J, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg J, Joseph N, Gao J et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature.* 2009;459:55–60.
 130. Sharma B, Singh N. Attenuation of vascular dementia by sodium butyrate in streptozotocin diabetic rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2011;215:677–87.
 131. Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B et al. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci.* 2003;23(28):9418–27.
 132. Irwin MH, Moos WH, Faller DV, Steliou K, Pinkert CA. Epigenetic Treatment of Neurodegenerative Disorders: Alzheimer and Parkinson Diseases. *Drug Dev Res.* 2016;77(3):109–23.
 133. Takuma K, Hara Y, Kataoka S, Kawanai T, Maeda Y, Watanabe R et al. Chronic treatment with valproic acid or sodium butyrate attenuates novel object recognition deficits and hippocampal dendritic spine loss in a mouse model of autism. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;126:43–9.
 134. Govindarajan N, Agis-Balboa RC, Walter J, Sananbenesi F, Fischer A. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *J Alzheimer's Dis.* 2011;26:187–97.
 135. Lattal KM, Barret RM, Wood A. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci.* 2007;121(5):1125–31.
 136. Wei YB, Melas PA, Wegener G, Mathé AA, Lavebratt C. Antidepressant-like effect of sodium butyrate is associated with an increase in tet1 and in 5-hydroxymethylation levels in the BDNF gene. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015;18(2):1–10.
 137. Jürgensen S, Antonio LL, Mussi GAE, Brito-Moreira J, Bomfim TR, De Felice FG et al. Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid- β oligomers. *J Biol Chem.* 2011;286(5):3270–6.
 138. Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, Ribeiro FC, Costa CV, Melo HM et al.

- Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight AB oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight. *J Neurosci*. 2013;33(23):9626–34.
139. Stoppini L, Buchs A, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*. 1991;37:173–82.
 140. Frozza RL, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran RA et al. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res*. 2009;34(2):295–303.
 141. Ankarcrona M et al. Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995;15(4):961–73.
 142. Happ DF, Tasker RA. A method for objectively quantifying propidium iodide exclusion in organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci Methods*. 2016;269:1–5.
 143. Susan E, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*. 1986;16:355–7.
 144. Figueiredo CP, Bicca MA, Latini A, Prediger RDS, Medeiros R, Calixto JB. Folic acid plus alfa-tocopherol mitigates amyloid-beta-induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complex activity. *J Alzheimer's Dis*. 2011;24:61–75.
 145. Candido EPM, Davie JR. Sodium Butyrate Cultured Cells Inhibits Histone Deacetylation in. 1978;14(May):105–13.
 146. Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS, Roesler R et al. Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology*. 2008;55(5):788–92.
 147. Phillips RG, Ledoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual Fear Conditioning. *Behav Neurosci*. 1992;106(2):274–85.
 148. Humpel C. Neuroscience forefront review organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*. 2015;305:86–98.
 149. Maneghetti AB. Avaliação dos mecanismos envolvidos na toxicidade de oligômeros do peptídeo B-amiloide em cultura organotípica de hipocampo de ratos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2014.
 150. Cuadrado-Tejedor M, Ricobaraza A, Torrijo R, Franco R, Garcia-Osta A. Phenylbutyrate is a multifaceted drug that exerts neuroprotective effects and reverses the Alzheimer's disease-like phenotype of a commonly used mouse model. *Curr Pharm Des*. 2013;19(28):5076–84.
 151. Woodruff-pak DS. Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *J Alzheimer's Dis*. 2008;15:507–21.

152. Walsh D, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004;44(1):181–93.
153. Govindarajan N, Rao P, Burkhardt S, Sananbenesi F, Schülter OM, Bradke F et al. Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*. 2013;5:52–63.
154. McQuown SC, Barret RM, Matheos DP, Post RJ, Rogge GA, Alenghat T et al. HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci*. 2011;31(2):764–74.
155. Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Pérez-Mediavilla A, Frechilla D, Río JD, García-Osta A. Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34:1721–32.
156. Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*. 2003;34(4–5):385–97.
157. Rosi S, Ramirez-Amaya V, Hauss-Wegrzyniak B, Wenk GL. Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. *J Neuroinflammation*. 2004;1:1–9.
158. Wood JA, Wood PL, Ryan R, Graff-Radford NR, Pilapil C, Robitaille Y et al. Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 beta or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, alfa2-macroglobulin and C-reactive protein. *Brain Res*. 1993;629:245–52.
159. Rogers J, Webster W, Lue L, Brachova L, Civin WH, Emmerling M et al. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging*. 1996;17(5):681–6.
160. Zuliani G, Ranzini M, Guerra G, Rossi L, Munari MR, Zurlo A et al. Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Psychiatr Res*. 2007 Oct;41:686–93.
161. Yaffe K, Lindquist K, Pennix BW, Simonsick EM, Pahor M, Kritchevsky S et al. Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology*. 2003;61(1):76–80.
162. Nybo L, Nielsen B, Pedersen BK, Moller K, Secher NH. Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise. *J Physiol*. 2002;542(3):991–5.
163. Pollmacher T, Haack M, Schuld A, Reichenberg A, Yirmiya R. Low levels of circulating inflammatory cytokines - Do they affect human brain functions? *Brain Behav Immun*. 2002;16(5):525–32.
164. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning , memory , neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun*. 2011;25(2):181–213.
165. Huuskonen J, Suuronen T, Nuutinen T, Kyrölenko S, Salminen A. Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. *Br J Pharmacol*. 2004;141:874–80.

166. Jobin C, Sartor RB. The I κ B/NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:451–62.
167. Canani RB, Costanzo MD, Leone L. The epigenetic effects of butyrate : potential therapeutic implications for clinical practice. *Clin Epigenetics*. 2012;4(4):1–7.
168. Lührs H, Gerke T, Müller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberger F et al. Butyrate Inhibits NF- κ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scan J Gastroenterol*. 2002;37(4):458–66.
169. Tobinick E, Gross H, Weinberger A, Cohen H. TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *MedGenMed*. 2006;26(8):6–8.
170. Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. Beta-Amyloid Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade via Hippocampal α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors : In Vitro and In Vivo Mechanisms Related to Alzheimer ' s Disease. *Neuroscience*. 2001;21(12):4125–33.
171. McDonald DR, Bamberger ME, Combs CK, Landreth GE. Beta-Amyloid fibrils activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in microglia and THP1 monocytes. *Neuroscience*. 1998;18(12):4451–60.
172. Savage MJ, Lin Y, Ciallella JR, Flood DG, Scott RW. Activation of c-Jun N-Terminal Kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition. *Neuroscience*. 2002;22(9):3376–85.
173. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Yang F et al. Correlative memory deficits, AB elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* (80-). 1996;274:99–102.
174. ZHU X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA. Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer's disease. *J Neurophatology Exp Neurol*. 2000;59(10):880–8.
175. Gray CW, Patel AJ. Regulation of fl-amyloid precursor protein isoform mRNAs by transforming growth factor- / 31 and interleu n-lfl in astro es. *Mol Brain Res*. 1993;19:251–6.
176. Rowan MJ;, Klyubin I;, Wang Q;, Anwyl R. Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid β -protein on synaptic plasticity. *Exp Gerontol*. 2004;39(11–12 SPEC. ISS.):1661–7.
177. Chwang WB, Arthur JS, Schumacher A, Sweatt JD. The Nuclear Kinase Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 Regulates Hippocampal Chromatin Remodeling in Memory Formation. *JNeurosci*. 2007;27(46):12732–42.
178. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T et al. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation*. 2005;2(22):1–12.

179. Lim GP, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B et al. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2000;20(15):5709–14.