

Universidade Estadual do Centro-Oeste

**Estudo dos possíveis efeitos neuroprotetores de curcumina e apocinina
em modelo animal de neuroinflamação aguda**

Guarapuava

2016

PAOLA FERNANDA DE SOUZA

**Estudo dos possíveis efeitos neuroprotetores de substâncias antioxidantes
em modelo animal de neuroinflamação aguda**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicada à Farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste

Orientador: Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

**Guarapuava
2016**

Catálogo na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

S729e SOUZA, Paola Fernanda de.
Estudo dos possíveis efeitos neuroprotetores de curcumina e apocinina em modelo animal de neuroinflamação aguda / Paola Fernanda de Souza. – Guarapuava, PR : [s.n], 2016.
48f.

Orientador: Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti
Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicada à Farmácia. Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.

1. Dissertação – Farmácia – Biociência. 2. Medicina – Alzheimer. 3. Apocinina. 4. Curcumina. 5. Déficit cognitivo. 6. Neuroproteção. I. Silva, Weber Cláudio Francisco Nunes da. II. Malfatti, Carlos Ricardo Maneck. III. UNICENTRO. IV. Título.

CDD 615.7

AGRADECIMENTOS

- Início meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!
- A meus pais, Luiz Fernando e Margarete, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!
- A meu querido esposo, José Augusto Filho, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio irrestrito e imprescindível mesmo quando isto significava ficarmos separados por algum tempo, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!
- Ao meu sogro, José Augusto, a minha gratidão pelo apoio e compreensão ao longo deste período. Aos meus cunhados, Volnei e Silvia, pela hospitalidade e suporte fornecido para que eu estivesse presente no desenvolvimento do experimento.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Weber, que acreditou em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponível e disposto a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento. Agradecer todo o apoio científico que me deu ao longo da realização do presente trabalho e o empenho demonstrado na fase de finalização desta dissertação. Fez-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, mas vidas humanas... Você não foi somente um orientador mas, em alguns momentos, conselheiro, confidente e amigo. Você é uma referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar tanto em mim!
- Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ricardo Malfatti, pela disponibilidade dos equipamentos e de seu laboratório.
- Não posso deixar de mencionar a todos os colegas de laboratório pela amizade e auxílio, no dia a dia. A Vaitsa (a menina que demorei para gravar o seu nome) pelo apoio e participação nesse trabalho me ajudando em todos os momentos.

NINGUÉM VENCE SOZINHO.....OBRIGADA A TODOS!!!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	1
Resumo	3
Capítulo 1: Introdução	4
Capítulo 2: Revisão da Literatura	8
2.1 Neuroinflamação	8
2.2 Curcumina	11
2.3 Apocinina	14
2.4 Memória Espacial	15
Capítulo 3: Objetivos	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
Capítulo 4: Metodologia	20
4.1 Animais Experimentais	19
4.2 Administração aguda de LPS (modelo neuroinflamação aguda)	19
4.3 Tratamento Farmacológico	21
4.4 Labirinto aquático de Morris (LAM)	21
4.5 Análise Histológica	22
4.6 Análise Estatística dos Dados	24
Capítulo 5: Resultados	25
5.1 Curva dose-resposta do LPS intra-hipocampal	25
5.2 Efeito da Curcumina	26
5.3 Efeito da Apocinina	27
5.4 Análise Histológica	29
Capítulo 6: Discussão	31
6.1 Modelo de neuroinflamação aguda	31
6.2 Curcumina	32
6.3 Apocinina	33

Capítulo 7: Conclusões	36
Referências Bibliográficas	37
Anexo: Ofício nº 047/2015 – CEUA/UNICENTRO	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico
ANOVA	Análise de Variância
APP	Proteína Precursora Amiloide
A β	peptídeo β -amilóide
A β -40	peptídeo β -amilóide com 40 resíduos de aminoácidos
A β -42	peptídeo β -amilóide com 42 resíduos de aminoácidos
BACE-I	enzima clivadora da APP no sítio β
CA1	cornu de Amon 1 (uma região hipocampal)
COX ₂	enzima ciclo-oxigenase 2
CTF	polipeptídeo transmembrana α -Fragmento C-terminal
DA	Doença de Alzheimer
DL ₅₀	Dose Letal 50%
EROs	espécies reativas de oxigênio
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
HE	coloração hematoxilina-eosina
IFN- γ	interferon gama
IL-1, -1 β , -2, -6, -8, -12	interleucina 1, 1 β , 2, 6, 8 ou 12, respectivamente.
iNOS	enzima óxido nítrico sintase indutível
LAM	labirinto aquático de Morris
LOX	lipoxigenase
LPS	lipopolissacarídeo
LTP	Potenciação de Longa Duração
MPO	enzima mieloperoxidase
mPrP	proteína príon murina recombinante

NADPH	nicotinamida adenina difosfato reduzida
NMDA	ácido N-metil-aspártico
NO	óxido nítrico
NOX	enzima oxidase nicotinamida
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PIR	Proteólise Regulada Intramembranar
PrP	proteína príon recombinante
s-APP- α	fragmento de APP segregado pela ação da α -secretase
s-APP- β	fragmento de APP segregado pela ação da β -secretase
SIRS	síndrome de resposta inflamatória sistêmica
TLRs	receptores do tipo Toll
TNF- α	fator de necrose tumoral α

RESUMO

O cérebro com patologia de Alzheimer é caracterizado pela presença de numerosas placas extracelulares compostas por peptídeos β -amilóides no espaço extracelular, e de emaranhados neurofibrilares no espaço intracelular neuronal. As placas amilóides são formados a partir do peptídeo $A\beta$, o qual é um produto proteolítico da proteína precursora de amilóide (APP). A neuroinflamação mediada por ativação glial é identificada como uma característica comum durante a progressão de muitas doenças neurodegenerativas. Considera-se que a micróglia, células com potencial fagocítico do sistema imune específicas do tecido nervoso, desempenham um papel chave na regulação da neurotoxicidade mediada por uma resposta inflamatória. Por isso, neste projeto, optamos por utilizar um modelo que mimetiza um quadro de inflamação aguda como um provável agente desencadeador de processos neurodegenerativos. Este modelo consiste em ratos submetidos a um protocolo de inflamação aguda desencadeada por LPS injetado intraparenquimal, na região CA1 hipocampal na dose de 40 μ g/lado, conforme descrito e histopatologicamente validado por Deng XH et al. Para validar este modelo comportamentalmente, foi utilizado uma tarefa de aprendizado espacial, o labirinto aquático de Morris, amplamente descrita e empregada para a avaliação da capacidade mnemônica dos animais. Após esta validação, mostrando que há déficit cognitivo nos animais submetidos ao modelo de inflamação aguda, nosso objetivo foi tentar reverter o quadro amnésico subsequente ao processo neuroinflamatório desencadeado pela LPS, testando fármacos com atividade anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora, como, curcumina e a apocinina na dose de 50mg/kg rato. Nossos resultados mostram que a terapia crônica com curcumina não teve nenhum efeito em melhorar ou piorar o desempenho cognitivo dos animais testados em quaisquer dos grupos analisados. No tratamento crônico com apocinina parece ter revertido o déficit no desempenho cognitivo na retenção de memória de longo prazo causado pelo LPS aos animais. O modelo de neuroinflamação aguda foi implementado com sucesso. Ainda, verificou-se em uma análise histológica qualitativa a presença de lesões parenquimatosas inflamatórias em maior extensão na região hipocampal. Dos fármacos aqui avaliados a curcumina foi inefetiva e a apocinina conseguiu reverter o déficit mnemônico tardio apresentado no grupo que sofreu neuroinflamação.

Palavras chaves: Neuroinflamação, apocinina, curcumina, déficit cognitivo, neuroproteção.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por progressiva perda neuronal, subjacente a progressiva perda de funções cognitivas, sobretudo memória e capacidade de aprendizado⁽¹⁾. Tem sido sugerido que o desequilíbrio oxidativo e o dano neuronal resultante podem desempenhar um papel crítico na iniciação e progressão da doença de Alzheimer⁽²⁾.

O cérebro com patologia de Alzheimer é caracterizado pela presença de numerosas placas extracelulares compostas por peptídeos β -amilóides no espaço extracelular, e de emaranhados neurofibrilares no espaço intracelular neuronal⁽³⁻⁵⁾, como representado na Figura 1.

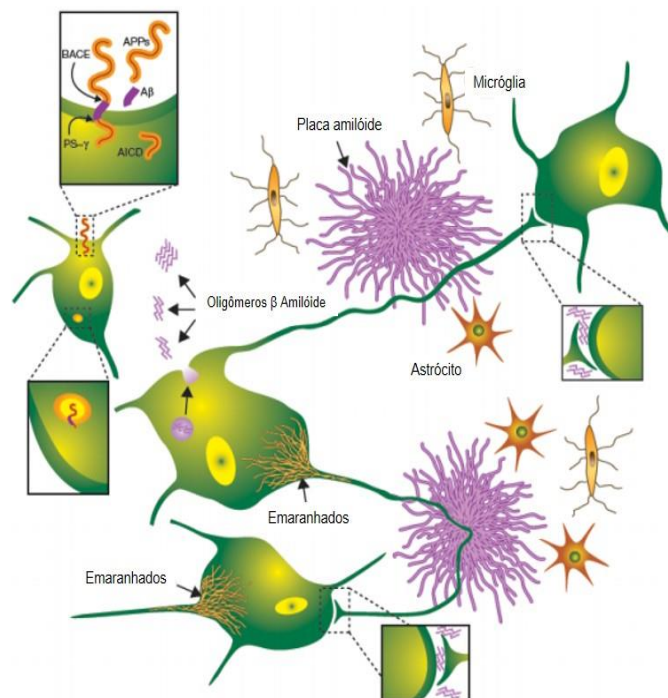


Figura 1. Representação da citopatologia do mal de Alzheimer, mostrando os agregados neurofibrilares, os oligômeros de peptídeos amiloides (A β) e as placas senis^(6, 7).

Embora se considere que o peptídeo β -amilóide ($A\beta$) desempenhe um papel chave na patogênese da doença de Alzheimer (DA)^(8, 9), ainda permanece incerto se as placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares são as causas primárias de DA. Essas dúvidas são abastecidas pela descoberta que a carga de placa amilóide correlaciona-se fracamente com a progressão e severidade da demência na DA.

As placas amilóides são formados a partir do peptídeo $A\beta$, o qual é um produto proteolítico da proteína precursora de amilóide (APP). A APP é uma proteína transmembranar de tipo 1, que é expressa ubiquamente em humanos. Embora a função biológica de APP permaneça obscura, pesquisas indicam que a APP desempenha um papel crucial na patogênese da via de produção de $A\beta$ ⁽¹⁰⁾. A APP sofre proteólise regulada intramembranar (PIR) por uma de duas proteases, α ou β -secretase. A clivagem por α -secretase (via não-amiloidogênica) libera o fragmento de APP segregado (s-APP- α), e o polipeptídeo transmembrana α -Fragmento C-terminal (CTF). A clivagem por β -secretase, (via amiloidogênica), produz s-APP- β e o CTF^(11, 12). Os peptídeos $A\beta$ podem se acumular e formar oligômeros que, eventualmente, dão origem a placas amilóides⁽¹³⁾. A acumulação de oligômeros de $A\beta$ pode levar a perda sináptica e neurodegeneração⁽¹⁴⁾. Formas raras de início precoce da doença de Alzheimer surgem de mutações que conduzem à produção de $A\beta$ elevada. Esta mudança de $A\beta$ pode surgir a partir de níveis elevados de APP devido a mutações em APP ou de aumento do número de cópias de APP como observado na síndrome de Down (trissomia 21)^(15, 16).

A clivagem pelas secretases produz peptídeos diferentes: o $A\beta$ -40, que é a espécie predominante, e o $A\beta$ -42, que é o componente principal da formação de placas senis. O peptídeo $A\beta$ -42 é mais propício para agregação e do que o $A\beta$ -40, assim, $A\beta$ -42 se acumula formando aglomerados sob a forma de placas senis no sistema límbico, principalmente no córtex, exercendo assim efeitos tóxicos em sinapses neuronais⁽¹⁷⁾.

O peptídeo $A\beta$ pode promover neurodegeneração através de mecanismos incluindo a ativação de células da micróglia e astrócitos. A indução de resposta inflamatória micróglia-dirigida resulta na liberação de vários mediadores inflamatórios, incluindo uma ampla variedade de citocinas neurotóxicas^(8, 18, 19). Uma vez ativada, a micróglia pode recrutar astrócitos que ativamente intensificam a resposta inflamatória aos depósitos extracelulares de $A\beta$. Este componente neuroinflamatório da DA é caracterizado ainda por uma resposta aguda local mediada por citocinas, ativação da cascata do complemento e indução de enzimas inflamatórias tais como a óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclo-oxigenase 2 (COX₂). Todos esses

fatores podem contribuir para a disfunção e morte neuronal, isoladamente ou em conjunto^(8, 20, 21).

A neuroinflamação mediada por ativação glial é identificada como uma característica comum durante a progressão de muitas doenças neurodegenerativas⁽²²⁾. Considera-se que a micróglia, células com potencial fagocítico do sistema imune específicas do tecido nervoso, desempenham um papel chave na regulação da neurotoxicidade mediada por uma resposta inflamatória⁽²³⁾. A ativação microglial pode ser induzida por lipopolissacarídeo (LPS), interferon gama (IFN- γ) ou β -amilóide in vitro⁽²⁴⁾. A micróglia ativada pode produzir um grande número de fatores pró-inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α), prostaglandinas, interleucinas (IL-1 β , IL-6) e radicais livres tais como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs)⁽²³⁻²⁷⁾. Estes fatores neurotóxicos podem causar dano neuronal, resultando na evolução de doenças neurodegenerativas^(24, 28). Em paralelo, os astrócitos excessivamente ativados também agravam a patogênese de doenças neurodegenerativas^(29, 30). Tomados em conjunto, a ativação inflamatória das células gliais desempenham um papel chave na patogênese de doenças neurodegenerativas^(22, 25, 31). Portanto, a inibição da ativação mediada por células da glia representa uma abordagem terapêutica importante para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Os mecanismos de excitotoxicidade contribuem significativamente para a perda neuronal na DA^(32, 33). Neste contexto, deve-se notar que os efeitos citotóxicos do NO derivado da iNOS, bem como de várias outras moléculas pró-inflamatórias não são simplesmente aditivos mas ao invés potencializam a excitotoxicidade mediada por receptores NMDA e AMPA/cainato^(34, 35).

Todos esses mecanismos pró-inflamatórios e excitotóxicos, bem como outros, além de acarretarem em neurodegeneração e subsequente perda neuronal, afetam processos fisiológicos de plasticidade neuronal antes de desencadear mudanças patológicas mais drásticas. Um exemplo de processo fisiológico de plasticidade alterado em neurônios é a LTP (potenciação de longa duração). A LTP é um processo chave para a formação e consolidação de memórias. Uma vez que várias citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 β e INF- γ são capazes de suprimir a LTP hipocampal, a presença dessas moléculas inflamatórias isoladamente pode ser suficiente para induzir disfunção neuronal sem afetar a estrutura do neurônio^(36, 37). Similarmente às citocinas, o NO em excesso derivado da iNOS também prejudica a LTP^(38, 39). Como a expressão de iNOS é um evento duradouro, os neurônios circundantes encontram-se expostos a uma produção sustentada de altas

concentrações de NO. Esse prejuízo funcional sobre a LTP causado pelo aumento de citocinas e da produção de NO pode ser de especial relevância nos estágios iniciais da DA, quando os pacientes apresentam declínio cognitivo leve a médio, e frequentemente num período em que as técnicas de imageamento cerebral falham em detectar qualquer atrofia cortical ou límbica⁽⁴⁰⁾.

Apesar dos progressos recentes na compreensão dos mecanismos de neurodegeneração característicos da doença de Alzheimer, não existe ainda nenhuma terapia eficaz. Boa parte da dificuldade de se testar novas terapias potenciais se deve à falta de bons modelos animais⁽⁴¹⁾. Até o momento, não existe modelos animais para a doença de Alzheimer que reproduzam adequadamente os processos neurodegenerativos subjacentes, cuja ocorrência espontânea é observada apenas nos primatas superiores. Por isso, neste projeto, optamos por utilizar um modelo que mimetiza um quadro de inflamação aguda como um provável agente desencadeador de processos neurodegenerativos, visando obter potenciais candidatos a ferramentas terapêuticas que possam agir tanto no início do quadro neurodegenerativo, quanto durante a progressão da DA, mesmo em estágios mais avançados, visto que os processos neuroinflamatórios descritos anteriormente estão presentes em todos esses períodos. Este modelo consiste em ratos submetidos a um protocolo de inflamação aguda desencadeada por LPS injetado intraparenquimal, na região CA1 hipocampal, conforme descrito e histopatologicamente validado por Deng XH et al⁽⁴²⁾.

Para validar este modelo comportamentalmente, foi utilizada uma tarefa de aprendizado espacial, o labirinto aquático de Morris, amplamente descrita e empregada para a avaliação da capacidade mnemônica dos animais^(43, 44). Após esta validação, mostrando que há déficit cognitivo nos animais submetidos ao modelo de inflamação aguda, nosso objetivo foi tentar reverter o quadro amnésico subsequente ao processo neuroinflamatório desencadeado pela LPS, testando fármacos com atividade anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora, como, curcumina⁽⁴⁵⁾ apocinina^(46, 47).

CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neuroinflamação

A deposição extracelular de peptídeo β -amilóide pode ser suficiente para induzir uma reação inflamatória que contribui subsequentemente para o declínio cognitivo característico da doença de Alzheimer. Tendo em vista a possibilidade de que esta deposição de peptídeo β -amilóide precede déficits cognitivos ou a manifestação clínica por décadas, pode-se esperar que fatores endógenos e exógenos possam modificar a resposta imune inata decorrente da exposição da micróglia às placas β -amilóides⁽⁴⁸⁾.

A proteína β -secretase (*beta site APP Cleaving Enzyme*, ou BACE-I) é uma aspartil-protease. BACE-I media a primeira clivagem da APP no resíduo 671, gerando o fragmento C-terminal C99 ligado à membrana, o qual é, posteriormente, clivado pela γ -secretase, resultando na liberação do peptídeo A β , na chamada via amiloidogênica como mostra a Figura 2^(6, 49).

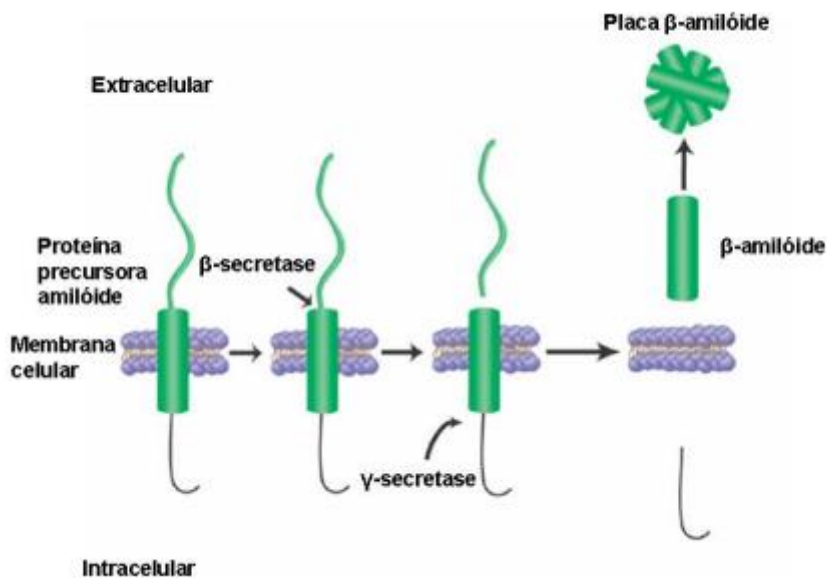


Figura 2. Clivagem da proteína precursora amilóide e formação da placa amilóide na chamada via amiloidogênica⁽⁶⁾.

O cérebro contém vários tipos de células com a capacidade de exercer funções imunitárias, incluindo os astrócitos, células da micróglia e macrófagos localizados nas meninges e espaços perivasculares de artérias e capilares cerebrais⁽⁵⁰⁾. Em um quadro de neuroinflamação aguda, o principal agente celular é a micróglia. Estas células contêm os receptores do tipo Toll (TLRs), que são importantes proteínas de transdução de sinal no sistema imune inato durante a resposta inflamatória. Estes são receptores que reconhecem endotoxinas bacterianas, iniciando então cascatas de sinalização intracelulares. O LPS é uma endotoxina encontrada na membrana exterior de bactérias gram-negativas e por meio de sinalização dos TLR induz a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e choque séptico em animais e seres humanos particularmente sensíveis⁽⁵¹⁾.

As micróglias são células imunitárias inatas distribuídas dentro do sistema nervoso central, onde interagem fisiológica e/ou patologicamente com neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. Fisiologicamente, participam da manutenção e plasticidade de circuitos neurais, contribuindo para a proteção e remodelamento de sinapses⁽⁵²⁾. Elas constantemente usam seus prolongamentos de grande motilidade para sondar as regiões cerebrais circundantes a procura de patógenos ou fragmentos de degradação (detritos) celulares, e quando os detecta, torna-se ativada⁽⁵³⁾. Uma vez ativada, ela estende seus prolongamentos para o local em questão, e em seguida migra para este local, onde iniciará a resposta imune inata (Figura 3). Micróglias ativadas são encontradas, por exemplo, em lesões circundando placas amilóides e na substância negra em degeneração na doença de Parkinson^(54, 55).

A liberação de citocinas inflamatórias pela micróglia ativada e os seus efeitos estão intimamente relacionadas com a patologia da DA. Estudos clínicos que procuram biomarcadores de prognóstico para o AD sugerem uma relação entre a inflamação e o desenvolvimento dos vários níveis da doença. Aumentos de TNF- α e IL-1 estão associados com a progressão da doença⁽¹⁹⁾.

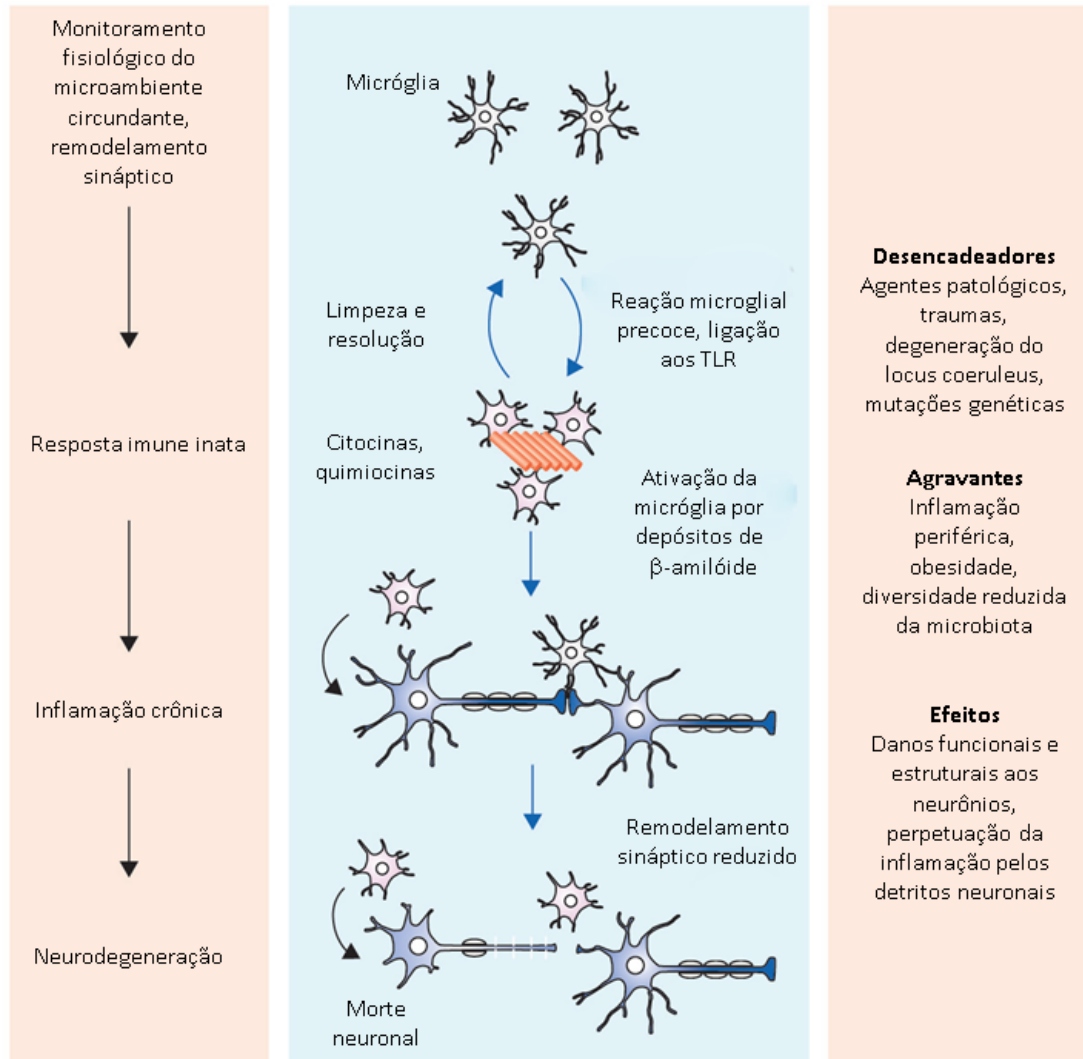


Figura 3. Patofisiologia da ativação microglial (Adaptado de Heneka et al., 2015⁽⁴⁸⁾).

As funções fisiológicas da micróglia, incluindo monitoramento tecidual e remodelamento sináptico, são comprometidas quando a micróglia detecta o acúmulo patológico de peptídeo β -amiloide. Inicialmente, a resposta inflamatória aguda é mobilizada para ajudar na limpeza e restauração da homeostase tecidual. Outros desencadeadores e agravadores promovem uma exposição continuada a resposta imune, que evolui para uma neuroinflamação crônica. A perpetuação da ativação microglial, exposição permanente a citocinas pró-inflamatórias e a retração dos prolongamentos causam mudanças funcionais e estruturais que resultam em degeneração neuronal⁽⁴⁸⁾. As citocinas liberadas no início do processo neuroinflamatório estimulam a indução da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) em micróglia e astrócitos, produzindo uma

alta concentração de óxido nítrico (NO) que pode ser prejudicial para as células vizinhas, neurônios inclusive, similarmente ao que ocorre no processo de excitotoxicidade⁽⁵⁶⁾.

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o NO, que conduzem a dano oxidativo e morte celular neuronal desempenha um papel importante na patogênese de doenças neurodegenerativas, o que sugere que os mecanismos fisiológicos de defesa antioxidantes estão incapacitados de lidar com o aumento de níveis de EROs nessas doenças⁽⁵⁷⁾. Desta forma, torna-se interessante verificar se, em um modelo animal de neuroinflamação aguda, substâncias com propriedades antioxidantes podem evitar ou mesmo reverter os danos teciduais e cognitivos causados pelo excesso de EROs produzidos pela ativação microglial, o que pode ser uma alternativa útil para o tratamento de DA já desde seu estágio inicial. A seguir, segue uma breve revisão da literatura sobre duas substâncias candidatas a exercer este papel, a curcumina e a apocinina, e que foram testadas neste trabalho.

2.2 Curcumina

A curcumina, um polifenol diaril-heptanóide isolado a partir dos rizomas de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae, nome comum: açafrão) é um aditivo alimentar na culinária indiana e é usada na antiga medicina holística conhecida como ayurvédica⁽⁵⁸⁾. A curcumina administrada como extrato em pó padronizado contendo um mínimo de concentração de 95% dos três curcuminóides somados (curcumina, bisdemetóxi-curcumina e demetóxi-curcumina, Figura 4) tem um excelente perfil de segurança com nenhuma toxicidade observada em doses únicas de até 12 g por dia⁽⁵⁹⁾. A curcumina é sem dúvida uma das especiarias mais utilizadas em todo o mundo, como é evidente a partir de seus inúmeros nomes, tal como adotados pelos moradores, ou seja: açafrão indiano, Kurkum, gengibre amarelo e Basah kunyit. O "toque mágico" de açafrão na cura de várias doenças devido ao seu amplo espectro de atividades farmacológicas tem sido observado desde os tempos antigos⁽⁶⁰⁾.

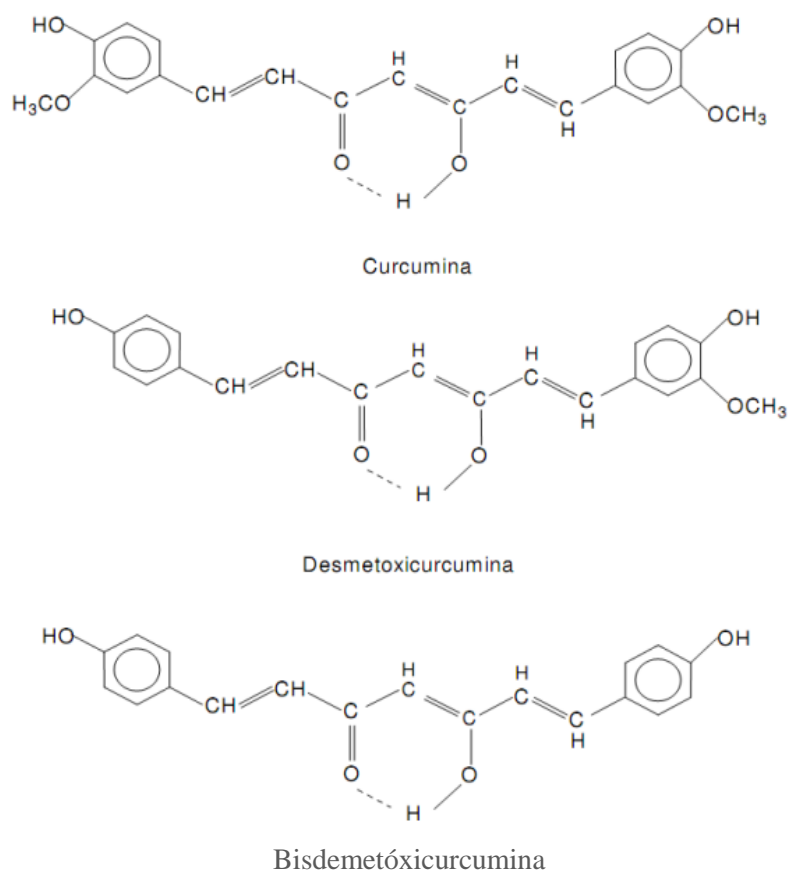


Figura 4. Fórmula estrutural dos compostos curcuminóides (Adaptado de Peret-Almeida et al., 2008).

É um fato conhecido que a curcumina é um forte composto antioxidante com grande capacidade de sequestrar os radicais livres derivados de oxigênio. Conseqüentemente, a curcumina pode ser um potencial agente neuroprotetor⁽⁶⁰⁾. A curcumina atravessa a barreira hematoencefálica e penetra no SNC exercendo uma vasta gama de efeitos anti-inflamatórios. Considerando a baixa biodisponibilidade da curcumina, várias preparações de curcumina tem sido testadas, tais como nanopartículas, lipossomas ou complexos de inclusão que estão disponíveis no mercado⁽⁶¹⁾.

A curcumina é conhecida por exibir várias propriedades pleiotrópicas, incluindo antioxidantes, anti-inflamatória, anti-amiloidogênica, lipofílica e nootrópica, o que sugere um potencial de natureza neuroprotetora deste composto^(62, 63). Além disso, a curcumina tem uma ampla ação anti-inflamatória por meio da ativação de citocinas supressoras, que regulam negativamente a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), TNF- α , IL-1, -2, -6, -8, -12⁽⁶⁴⁾. Também inibe a expressão de lipoxigenase (LOX), levando a uma diminuição dos níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) e óxido nítrico (NO)^(65, 66). Ainda, a curcumina reduz a oxidação de proteínas⁽⁶⁷⁾. Possui

também efeitos anti-inflamatórios em várias condições patológicas em humanos, incluindo artrite reumatóide, doenças gastrointestinais e várias formas de câncer. Por último, mas não menos importante, a curcumina inibe a agregação do peptídeo A β ₄₀ e impede a formação do peptídeo A β ₄₂, reduzindo portanto a toxicidade resultante de seus agregados⁽⁶⁸⁾.

A curcumina foi testada quanto a sua capacidade para inibir o dano oxidativo e inflamatório em camundongos transgênicos Tg2576⁽⁶⁹⁾. Neste estudo, os camundongos Tg2576 com idade de aproximadamente 10 meses de idade foram alimentados com uma dieta contendo curcumina (160 ppm) por 6 meses. Os seus resultados mostraram que a dieta contendo curcumina reduziu significativamente os níveis de proteínas oxidadas, IL-1 β , GFAP (um marcador de astrócitos ativados), A β solúvel e insolúvel, e a quantidade de placas amilóides. Seguindo este trabalho, Yang et al.⁽⁶⁸⁾ avaliaram o efeito da alimentação de uma dieta curcumina (500 ppm), em camundongos Tg2576 de 17 meses de idade durante 6 meses. A curcumina resultou na redução dos níveis de amiloide solúvel e de placas. Yang et al.⁽⁶⁸⁾ também demonstraram que quando a curcumina foi injetada periféricamente (através da artéria carótida), ela se ligou às placas amilóides. A capacidade de se ligar à placa amiloide deve-se provavelmente à sua semelhança estrutural com o corante hidrofílico vermelho do Congo, o qual é capaz de corar placas amilóides.

Existem diversos estudos que demonstram que a curcumina é uma droga muito promissora no tratamento de demências como é o caso da DA, por possuir potente atividade anti-inflamatória e antiamiloidogênica. Singh et al.⁽⁷⁰⁾ demonstraram uma possível atividade antiinflamatória da curcumina, por suprimir a ativação do fator de transcrição NF-kB em linhagens humanas de células de leucemia mieloblástica.

Begum et al.⁽⁷¹⁾, através de estudos *in vitro*, mostraram que a curcumina diminuiu os níveis proteicos de iNOS, induzida por LPS. Assim como atenuou os níveis de interleucina 1 (IL- 1) induzida por LPS, bem como reduziu a formação de oligômeros e fibrilas de beta amiloide.

Ainda, um estudo envolvendo proteína príon murina recombinante PrP (mPrP), onde a formação de fibrilas amilóides fora detectada pela intensidade de fluorescência de tioflavina, mostrou que na ausência de curcumina a intensidade de fluorescência é maior, indicando que a curcumina reduz a formação de fibrilas amilóides⁽⁷²⁾.

Estes dados levantam a possibilidade de que a suplementação dietética com a curcumina pode proporcionar um potencial tratamento preventivo e terapêutico para a DA.

2.3 Apocinina

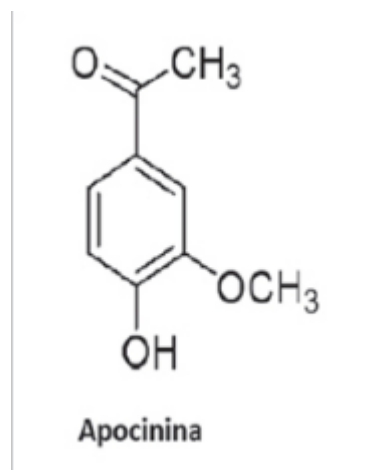


Figura 5. Estrutura química da apocinina⁽⁷³⁾.

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, Figura 5) é uma acetofenona que possui algumas características, como um leve odor de baunilha, capacidade de formar cristais na água e baixa toxicidade. Os efeitos colaterais da apocinina não são conhecidos, mas sabe-se que tem muito baixa toxicidade (DL₅₀ 50,9 g/kg) após a administração oral em camundongos⁽⁷⁴⁾. Pertence à classe dos metóxi-catecóis, foi descrita pela primeira vez em 1883 por Schmiedeberg quando foi isolada das raízes da planta *Apocynum cannabinum* (maconha canadense). Em 1971, foi isolada das raízes da planta nativa do Himalaia *Picrorhiza kurrooa*, muito utilizada na medicina tradicional indiana. Desde então, tem sido utilizada como um potente e inibidor não tóxico da ativação do complexo multienzimático NADPH oxidase em fagócitos e células não fagocíticas, apresentando, portanto, potencial antiinflamatório⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾.

A enzima mieloperoxidase (MPO), expressa por neutrófilos, é extremamente importante para a ação inibitória da apocinina⁽⁷⁹⁾. Nessas células fagocíticas, em presença da MPO e peróxido de hidrogênio, a apocinina forma um dímero e conseqüentemente inativa o complexo NADPH-oxidase⁽⁸⁰⁾. Em células não fagocíticas (células vasculares, células endoteliais), ou seja, células que não apresentam MPO, a apocinina atua como antioxidante, reduzindo as espécies reativas já formadas^(80, 81).

Múltiplos processos fisiopatológicos estão associados às espécies reativas, como envelhecimento, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, respiratórias e tumorais⁽⁸²⁾. O aumento da atividade NADPH-oxidase ou o desequilíbrio no balanço redox contribuem para processos inflamatórios subjacentes. A geração de EROs e a liberação de citocinas podem ser suprimidas pela apocinina, a qual também apresenta propriedades tipicamente relacionadas aos antiinflamatórios não esteroidais, ou seja, inibição da formação dos mediadores lipídicos da inflamação⁽⁸³⁾. A NADPH-oxidase é um complexo enzimático presente em fagócitos, inclusive na micróglia, que é ativado durante a defesa do hospedeiro para catalisar a produção de superóxido a partir de oxigênio⁽⁸²⁾. Uma variedade de estímulos, incluindo componentes bacterianos⁽⁸⁴⁾, peptídeos inflamatórios e várias outras neurotoxinas ativam a NADPH-oxidase microglial, fazendo com que aumente a produção de EROs neurotóxicos^(85, 86). A noção amplamente aceita que os EROs derivados de micróglia são mediadores importantes da lesão cerebral neurodegenerativa levanta a questão de saber se o perfil farmacológico favorável e baixa toxicidade da apocinina pode ser usado para tratamento neuroprotetor. Coerentemente com esta proposição, vários autores já relataram o efeito benéfico da apocinina em modelos de doenças neurológicas agudas, como a isquemia, hemorragia intracerebral, e acidente vascular cerebral⁽⁷⁴⁾.

2.4 Memória Espacial

Na literatura está bem estabelecido que a integridade da formação hipocampal é essencial para a aprendizagem espacial, mas os mecanismos neurais precisos sobre o envolvimento do hipocampo neste processo não está totalmente compreendido. Muitas evidências mostram que o hipocampo é necessário para a aquisição, a evocação, a consolidação e o armazenamento de informações espaciais⁽⁴³⁾. Certamente há o envolvimento de outras regiões cerebrais na navegação espacial, podendo abranger um número de regiões e vias de comunicações inter-regionais maior do que o originalmente proposto^(43, 87).

Muitas células piramidais hipocampais disparam quando um dado rato está em um local em particular, cuja localização seja definida, por exemplo, por diferentes pistas espaciais presentes em uma sala⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾. Estas células, denominadas células de lugar (*place cells* em inglês), foram sugeridas como o substrato primário de habilidades mnemônicas

espaciais que subjaz o processo de navegação espacial^(43, 92). A presença dessas células de lugar promoveu a elaboração de teorias segundo as quais o hipocampo de ratos funciona como um mapa espacial, e que pode realizar computações espaciais para implementar navegações dentro de ambientes contendo pistas espaciais suficientes^(89, 91, 93).

A tarefa comportamental do labirinto aquático de Morris (LAM, Figura 6) é talvez o paradigma de aprendizado mais utilizado para investigar o processamento de memórias espaciais⁽⁹⁴⁻⁹⁷⁾. Nesta tarefa, os ratos (ou outros pequenos roedores) são treinados para escapar da água, através do nado até uma plataforma escondida logo abaixo da superfície da água, cuja localização só pode ser encontrada utilizando-se pistas espaciais externas ao tanque que contém a água e a plataforma, como mostra a Figura 6. Análises comportamentais do aprendizado na tarefa do LAM indicam que há a mobilização de um grupo de processos cognitivos envolvidos por um lado com o armazenamento e evocação das informações visuais, e por outro lado com o planejamento e estratégias de navegação.



Figura 6: Esquema ilustrativo do protocolo experimental de aprendizado e teste de memória espacial de longo prazo na tarefa do labirinto aquático de Morris.

A intensidade da memória para a tarefa do LAM pode ser aferida em um teste no qual a plataforma é removida do tanque, e os ratos são largados e deixados nadar por um período de tempo, como ilustrado na Figura 6. Ratos normais nadam diretamente do ponto de largada até o local onde a plataforma se encontrava durante os dias de treino, e persistem procurando por ela nas proximidades desse local, o que se expressa como a porcentagem de tempo gasto no quadrante alvo (quadrante virtual cujo centro geométrico é o local onde se encontrava a plataforma) significativamente maior do que o esperado pela chance aleatória (25% do tempo de teste em cada quadrante). Se o tanque for totalmente envolto por cortinas, após várias sessões de treino sem essas cortinas, o desempenho do rato em encontrar o local da plataforma cai para o esperado pela chance aleatória. Por isso, o parâmetro de porcentagem do tempo de teste gasto no quadrante alvo também é denominado em alguns trabalhos como teste de transferência (*transfer test* em inglês). Neste trabalho, este parâmetro será doravante denominado **tempo de procura**.

Entretanto, se durante o teste, houver cortinas cobrindo apenas parte do tanque, o desempenho dos ratos é relativamente pouco afetado. Isso implica que as pistas espaciais externas ao tanque são essenciais para o aprendizado, mas que nenhuma pista na sala do LAM é absolutamente importante⁽⁴³⁾.

Assim durante o aprendizado espacial, o parâmetro quantitativo mais simples que evidencia a gradual mudança do desempenho do animal em encontrar o local da plataforma é o declínio no tempo que esse animal leva para encontrar esse local. Esse tempo é denominado **latência de escape**. Entretanto, como pode haver muitos outros fatores que contribuem para uma dada latência de escape além da taxa de aprendizagem espacial (incluindo tigmotaxia, déficits visuais, fatores atencionais e motivacionais), torna-se necessário conduzir outras análises de desempenho para se obter um quadro mais detalhado. Dentre essas análises, o **tempo de procura** (teste de transferência) é um dos mais importantes utilizados, pois fornece um parâmetro, independente da latência de escape e da velocidade de nado, da tendência de o animal persistir na procura pelo local onde a plataforma se encontrava durante todo o treino⁽⁴³⁾.

A tarefa do LAM foi descrita há 25 anos como um instrumento para investigação do aprendizado e memória espacial em ratos⁽⁹⁸⁾. Certamente, outras tarefas de aprendizado espacial foram desenvolvidas, estando entre elas o labirinto radial como o exemplo mais proeminente⁽⁹⁹⁾. Entretanto, quando comparadas ao LAM, as outras tarefas de aprendizado espacial são frequentemente mais complicadas e demandam protocolos de treino mais trabalhosos. A relativa simplicidade de implementação da tarefa do LAM

sem dúvida é uma das razões de seu contínuo sucesso. Além disso, a possibilidade de diferenciação entre as condições espaciais (plataforma de escape escondida) e não-espaciais (plataforma de escape visível) da tarefa é vista por muitos autores como sua principal vantagem⁽⁴³⁾. Uma vantagem adicional de labirintos aquáticos em relação aos secos é a menor probabilidade de interferência de rastros de odores sobre o comportamento de animais, o que poderia habilitá-los a empregar uma estratégia de navegação não-espacial (baseada no olfato) para solucionar o labirinto (encontrar o escape), apesar da ausência de pistas espaciais próximas. Uma outra vantagem verificada no LAM é que esta tarefa não requer privação de comida nem de água. Todas essas vantagens ajudam a explicar porque a tarefa do LAM têm sido amplamente utilizada nos estudos sobre memória espacial envolvendo lesões ou intervenções farmacológicas⁽⁴³⁾.

A tarefa do LAM possui uma particular sensibilidade aos efeitos de lesões hipocâmpais em ratos^(43, 98, 100). Muitos autores têm apresentado evidências para um envolvimento específico e desproporcional da formação hipocâmpal em aspectos espaciais do aprendizado na tarefa do LAM⁽⁴³⁾. Assim, ratos com os hipocâmpos lesionados apresentam déficit de aprendizado na tarefa de LAM quando a plataforma de escape não pode ser vista durante o treino, mas apresentam um desempenho normal quando a plataforma encontra-se visível. Interessantemente, o grau de prejuízo no aprendizado espacial em ratos com lesões hipocâmpais está relacionado com o volume de tecido hipocâmpal lesionado, e já foi demonstrado que lesões no hipocampo dorsal causam um prejuízo mais pronunciado do que lesões no hipocampo ventral^(101, 102).

Por fim, o hipocampo é uma das principais áreas corticais atingidas pela atrofia característica da DA, o que contribui para os sintomas de déficit mnemônico progressivo, bem como pela progressiva dificuldade em se formar novas memórias de longo prazo⁽¹⁰³⁾. Assim, o hipocampo é uma região cortical de interesse crítico para o estudo de possíveis terapias efetivas que minimizem ou mesmo revertam a perda de memórias.

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Implementar um modelo de neuroinflamação aguda em ratos, o qual foi utilizado para testar possíveis atividades neuroprotetoras terapêuticas de compostos antioxidantes e/ou anti-inflamatórios.

3.2 Objetivos Específicos

1) Implementar e adaptar para ratos o modelo animal de neuroinflamação aguda como descrito em Deng, X. H. et al.⁽⁴²⁾, e verificar neste modelo se, 4 semanas após a administração intra-hipocampal de LPS, 10 e 40 µg/lado, houve déficit mnemônico no aprendizado da memória espacial de longo prazo relativa à tarefa do labirinto aquático de Morris;

2) Investigar se e quais fármacos antioxidantes, e em qual dose, quando administrados cronicamente por via oral durante 4 semanas, a partir de dois dias após a administração intra-hipocampal de LPS, conseguem reverter:

2.1) O déficit mnemônico no aprendizado da memória espacial de longo prazo relativo à tarefa do labirinto aquático de Morris.

2.2) As lesões teciduais verificadas histologicamente.

CAPÍTULO 4: METODOLOGIA

4.1 Animais Experimentais

Para a realização dos estudos no Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmácia, UNICENTRO, foram utilizados 120 ratos Wistar machos adultos, pesando entre 225 e 350 gramas, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais foram mantidos na Sala do Labirinto Aquático de Morris do DEFAR, em caixas apropriadas com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha. Receberam água e comida à vontade, e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 8:00 h e escuro a partir das 20:00 h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22°C. As caixas foram trocadas a cada 3 dias. O máximo de precaução foi deliberado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Em cada grupo experimental, foram utilizados de 8 a 12 ratos, faixa mínima necessária para que seja detectada diferença significativa entre os grupos nas análises estatísticas, considerando-se o desvio padrão característico da tarefa do labirinto aquático de Morris (descrita a seguir) e um erro alfa igual ou inferior a 5%. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas do CEUA/UNICENTRO (Ofício nº 047/2015) e dos “Principles of laboratory animal care” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

4.2 Administração Aguda de LPS (Modelo de Neuroinflamação Aguda)

Dois dias após a chegada e alojamento dos animais no biotério de manutenção, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para administração intra-hipocampal (região CA1) bilateral de veículo (solução salina) ou LPS na dose de 10 ou 40 µg / lado, através da infusão de 4 µl durante 10 min. As coordenadas utilizadas para a cirurgia estereotáxica foram adaptadas do Atlas anatômico de Paxinos e Watson, sendo elas as seguintes: Antero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) = ± 3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 3,0 mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0° a partir do Bregma. Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com 75 mg/kg de cetamina (König, São Paulo) mais 10 mg/kg de xilazina (Coopers, São

Paulo), intra-peritoneal. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em caixas-moradia sob leve aquecimento, para evitar hipotermia, e por 2 dias receberam injeção intraperitoneal de tramadol (2 mg/kg a cada 12 horas) para analgesia pós-cirúrgica.

4.3 Tratamento Farmacológico

O tratamento se iniciou dois dias após a cirurgia e os ratos foram divididos em sete grupos:

- Grupo naive (controle absoluto): NAIVE;
- Grupo salina (intra-hipocampal) seguido de veículo (via oral): SAL + VCL;
- Grupo salina (intra-hipocampal) seguido de curcumina (via oral): SAL + CUR;
- Grupo salina (intra-hipocampal) seguido de apocinina (via oral): SAL + APO;
- Grupo LPS (intra-hipocampal) seguido de veículo (via oral): LPS + VCL;
- Grupo LPS (intra-hipocampal) seguido de curcumina (via oral): LPS + CUR;
- Grupo LPS (intra-hipocampal) seguido de apocinina (via oral): LPS + APO.

A curcumina e a apocinina foram administradas por gavagem, na dose de 50 mg/kg, estando a curcumina dissolvida em óleo vegetal, e a apocinina suspensa em água destilada. O tratamento farmacológico foi iniciado 4 semanas antes do início do treino na tarefa mnemônica do labirinto aquático de Morris. Os ratos controle (controle-tratamento) foram administrados com óleo vegetal ou água destilada apenas (veículos), tanto os ratos submetidos à administração intra-hipocampal de LPS quanto de salina (controle neuro-inflamação).

4.4 Labirinto Aquático de Morris (LAM)

Para a realização da tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM), utilizou-se um tanque circular azul escuro (180 cm de diâmetro e 60 cm de altura), com 40 cm de água mantida a 21-24°C. O tanque foi virtualmente dividido em quatro quadrantes, sendo que no centro de um desses quadrantes existia uma plataforma de 12 cm de diâmetro. Esta plataforma encontrava-se submersa 2 cm abaixo do nível da água.

Na sua versão espacial, dicas visuais na forma de luminárias e cartazes com cores contrastantes e padrões geométricos diferentes foram fixadas assimetricamente na parede e servem de pistas para a formação de um mapa espacial. O treino consistiu de uma sessão diária de 8 treinamentos consecutivos, cada sessão realizada durante 5 dias consecutivos.

Em cada treinamento, o animal era largado de um de quatro locais de largada, seguindo-se uma ordem pseudo-randômica de largadas, e esperava-se até 60 segundos até que o animal encontra-se a plataforma submersa. Caso ele não a encontrasse neste intervalo, ele era gentilmente conduzido até a plataforma. Uma vez sobre a plataforma, o rato era deixado ali por 30 segundos, para que pudesse se situar em relação às pistas externas ao tanque. A plataforma de escape foi mantida na mesma posição durante o treino.

Para o teste, realizado 24 horas após a última sessão de treino, a plataforma foi retirada do tanque, e o animal foi largado da posição do tanque mais distante do local onde ficava a plataforma nas sessões precedentes de treino. Os animais foram testados quanto à retenção de traço mnemônico a partir dos parâmetros: **tempo de procura** - tempo que o animal permaneceu nadando no quadrante alvo (quadrante onde a plataforma de escape esteve localizada durante o treino); e **latência de escape** - tempo que levou para atingir uma área centrada no local da plataforma.

4.5 Análise Histológica

Os ratos foram anestesiados com 75 mg/kg de cetamina (König, São Paulo) e 10 mg/kg de xilazina (Coopers, São Paulo), via intra-peritoneal, e em seguida foram decaptados, e seus cérebros mergulhados em solução de formol 10%. O restante do corpo de cada rato foi destinado a um freezer (-20°C), para posterior encaminhamento para incineração no local apropriado (Laboratório de Anatomia Veterinária, do Departamento de Veterinária).

Após uma semana mergulhados na solução de formol, cada cérebro foi fatiado coronalmente na região correspondente ao local de infusão de LPS. Essas fatias foram então coradas com hematoxilina-eosina, segundo o seguinte procedimento:

1º Passo: Diafanização das amostras

- Inserir as amostras nos cassetes de inclusão (caixinha plástica vazada), identificando cada um com lápis ou lapiseira e fechar;
- Colocar os cassetes em álcool absoluto (95%) por 9 horas em um Becker tampado;
- Tirar do álcool absoluto e colocar direto em outro Becker com xilol (xileno);
- Colocar posteriormente em parafina líquida na estufa a 65°C por mais 3 horas;
- Tirar os cassetes da parafina e colocar em um Becker vazio e manter na estufa até o início da inclusão.

2° Passo: Inclusão

- Ter parafina derretida em quantidade adequada para o número de amostras a serem incluídas;
- Arrumar os blocos de inclusão transparentes de modo a facilitar a inclusão (usa-se colocar jornal embaixo dos blocos);
- Retirar Becker com os cassetes da estufa;
- Abrir o cassete e retirar a amostra (com o auxílio de uma pinça) e coloca-la no centro do bloco, identificar cada bloco com o nome da amostra;
- Inserir a parafina derretida em cada bloco sem completar;
- Observar se a amostra saiu do lugar e arruma-la novamente de modo que ela fique no meio do bloco;
- Esperar a parafina endurecer e retirar dos blocos e colar identificação;
- Levar para o congelador.

3° Passo: Corte

- Retirar os blocos do congelador e mantê-los resfriados;
- Realizar os cortes no micrótomo (somente pessoas treinadas e autorizadas);
- Colocar os cortes em banho-maria e pescá-los com suas respectivas lâminas, previamente identificadas.

4° Passo: Coloração HE

- Levar as lâminas com os cortes para estufa (70-80 °C) por 30 minutos, para derreter a parafina;
- Xilol quente – 5 min;
- Xilol quente – 5 min;
- Álcool absoluto – 10 banhos;

- Álcool absoluto – 10 banhos;
- Álcool absoluto – 5 min;
- Água para lavar o álcool – 10 banhos (pode ser da torneira);
- Hematoxilina – 3min (retirar espelho metálico quando tiver) *tempo variável;
- Água corrente – 5 min;
- Eosina – 7min *tempo variável;
- Álcool absoluto – 10 banhos;
- Álcool absoluto – 10 banhos;
- Álcool absoluto – 10 banhos;
- Álcool absoluto – 10 banhos;
- Xilol fenicado – 1min (xilol com 10% de fenol);
- Xilol – 10 banhos;
- Xilol – 10 banhos;
- Xilol – 5 min e montagem das lâminas.

Após a execução deste procedimento, as lâminas obtidas foram analisadas visualmente por microscopia óptica e analisador de imagens.

4-6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As latências de escape e os tempos de procura foram comparadas de forma qualitativa entre os diferentes grupos através dos testes paramétrico de Student (dois grupos) ou ANOVA (mais de dois grupos) com teste post-hoc de Newman-Keuls. Valores de p menores do que 0,05 serão considerados estatisticamente significativos.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

5.1 Curva Dose Resposta do LPS Intra-Hipocampal

Os animais receberam a infusão intra-hipocampal de salina (SAL, barra azul) ou de LPS (LPS, 10 ou 40 $\mu\text{g}/\text{lado}$, barras cinza e preta, respectivamente), ou não foram submetidos a procedimento cirúrgico de infusão (NAIVE, barra branca). Trinta e dois dias após este procedimento, os ratos foram submetidos ao treino na tarefa do labirinto aquático de Morris.

Observamos que os animais que receberam infusão de LPS apresentaram uma queda de desempenho no teste de memória espacial de longo prazo mensurada através dos parâmetros latência de escape para a plataforma (Figura 7A), e tempo de procura no quadrante alvo (Figura 7B), sendo a dosagem de 40 $\mu\text{g}/\text{lado}$ a que apresentou significância estatística quando comparado ao grupo NAIVE.

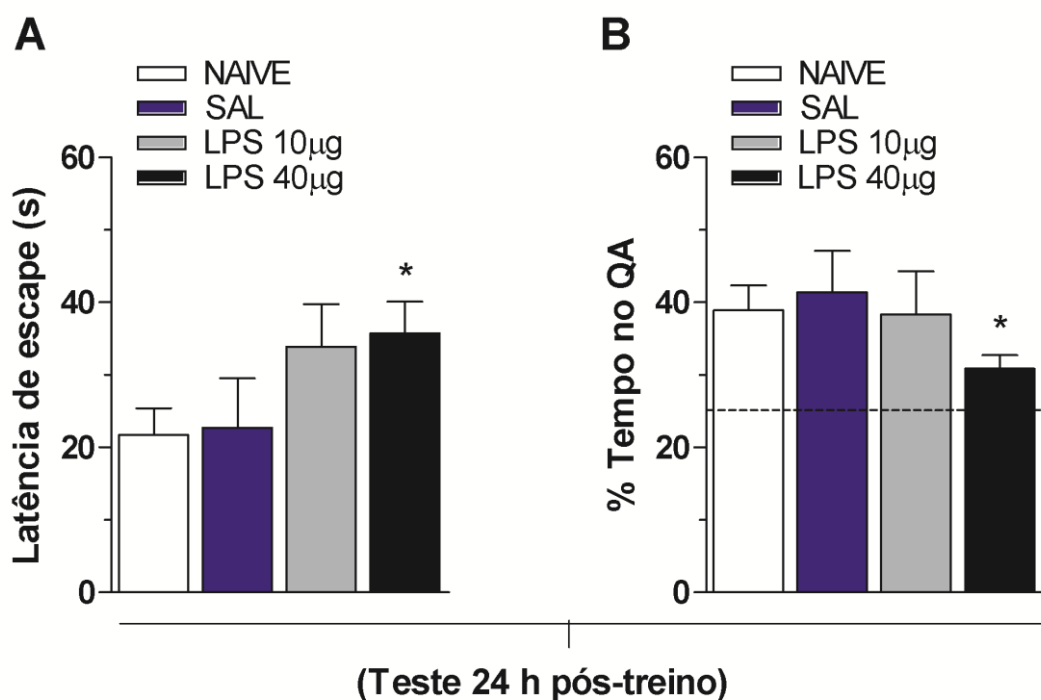


Figura 7. Infusão intra-hipocampal de LPS 30 dias antes do treino na tarefa do labirinto aquático de Morris prejudica a retenção de memória espacial adquirida nesta tarefa. Os dados foram expressos como média (\pm EM) da latência para nado até a localização prévia da plataforma de escape (A), ou da porcentagem de tempo gasto nadando no quadrante alvo (QA) (B). * $p < 0,05$ vs. NAIVE em teste t de Student ($n = 12$ por grupo).

Uma vez verificado que o LPS causa prejuízo mnemônico de longo prazo significativo e permanente quando administrado intra-hipocampal na dose de 40 µg/lado, esta foi a dose escolhida para o modelo de neuroinflamação aguda utilizado nos experimentos subsequentes.

5.2 Efeito da Curcumina

Os animais receberam a infusão intra-hipocampal de salina (SAL) ou de LPS (LPS, 40 µg/lado), ou não foram submetidos a procedimento cirúrgico de infusão (NAIVE, barra branca). Dois dias após recuperação do procedimento cirúrgico de infusão, metade dos animais dos grupos SAL e LPS receberam a administração por gavagem de óleo de soja (veículo, grupo SAL+VCL, barra azul; grupo LPS+VCL, barra preta), e a outra metade de cada grupo recebeu curcumina (50 mg/kg/dia, grupo SAL+CUR, barra amarela; grupo LPS+CUR, barra marrom), uma vez por dia, durante 30 dias. Em seguida, já transcorridos 32 dias após o procedimento cirúrgico de infusão, os ratos foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. A retenção da memória espacial de longo prazo foi mensurada através dos parâmetros latência de escape (Figura 8A) e tempo de procura (Figura 8B).

Nossos resultados mostram que a terapia crônica com curcumina não teve nenhum efeito em melhorar ou piorar o desempenho cognitivo dos animais testados em quaisquer dos grupos analisados. Ainda, os grupos que receberam LPS intra-hipocampal novamente apresentaram um significativo prejuízo mnemônico de longo prazo significativo e permanente, conforme verificado no parâmetro tempo de procura (Figura 8B).

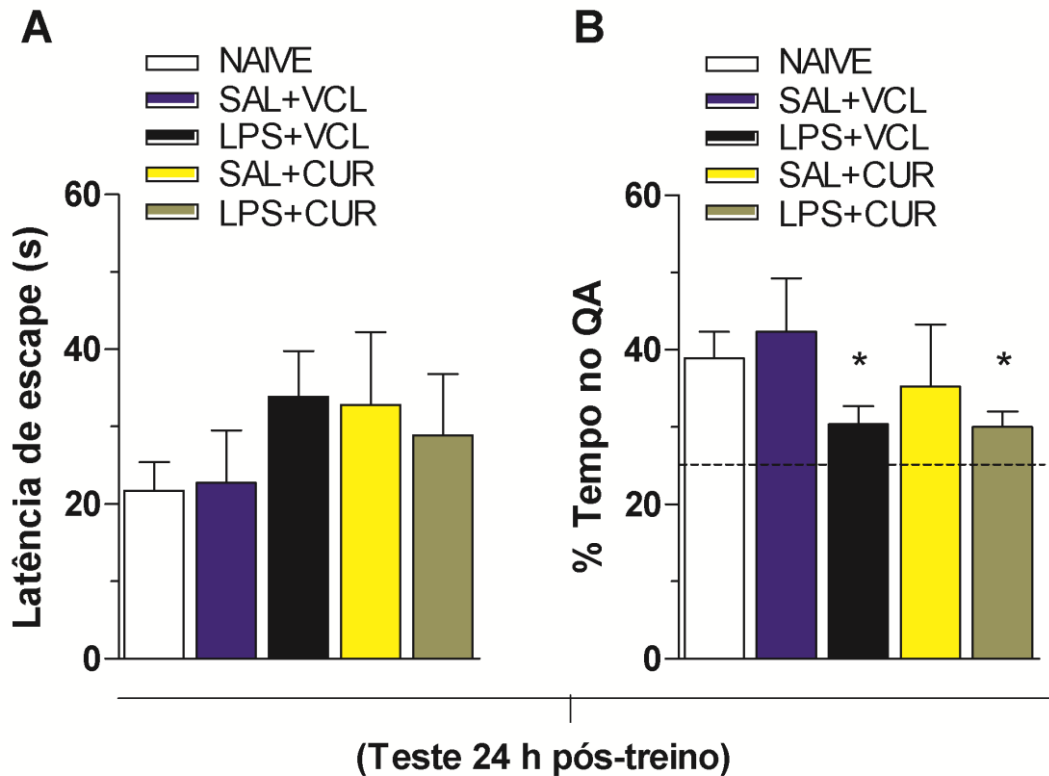


Figura 8. Administração por via oral de curcumina não reverte o déficit mnemônico causado pela infusão intra-hipocampal de LPS. Os dados foram expressos como média (\pm EM) da latência para nado até a localização prévia da plataforma de escape (A), ou da porcentagem de tempo gasto nadando no quadrante alvo (QA) (B). * $p < 0,05$ vs. NAIVE em teste t de Student ($n = 7-8$ por grupo).

5.3 Efeito da Apocinina

Os animais receberam a infusão intra-hipocampal de salina (SAL) ou de LPS (LPS, 40 μ g/lado), ou não foram submetidos a procedimento cirúrgico de infusão (NAIVE, barra branca). Dois dias após recuperação do procedimento cirúrgico de infusão, metade dos animais dos grupos SAL e LPS receberam a administração por gavagem de água destilada (veículo, grupo SAL+VCL, barra azul; grupo LPS+VCL, barra preta), e a outra metade de cada grupo recebeu apocinina (50 mg/kg/dia, grupo SAL+APO, barra verde; grupo LPS+APO, barra oliva), uma vez por dia, durante 30 dias. Em seguida, já transcorridos 32 dias após o procedimento cirúrgico de infusão, os ratos foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. A retenção da memória

espacial de longo prazo foi mensurada através dos parâmetros latência de escape (Figura 9A) e tempo de procura (Figura 9B).

A apocinina não melhorou e nem piorou o desempenho dos animais. No entanto, em comparação com o grupo LPS+VCL, o grupo LPS+APO apresentou um resultado de reversão comportamental do déficit mnemônico verificado pelo parâmetro tempo de procura no quadrante alvo, uma vez que este grupo obteve um desempenho similar ao dos grupos controle neste parâmetro (Figura 9B).

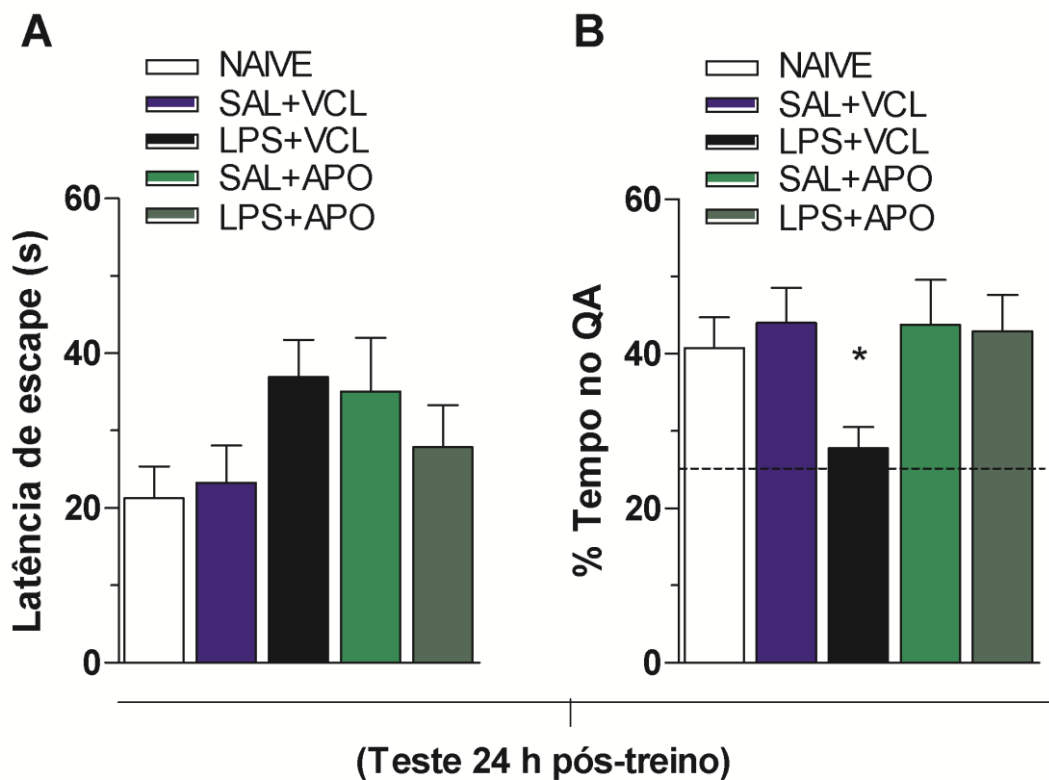


Figura. 9. Administração por via oral de apocinina reverte o déficit mnemônico causado pela infusão intra-hipocampal de LPS. Os dados foram expressos como média (\pm EM) da latência para nado até a localização prévia da plataforma de escape (A), ou da porcentagem de tempo gasto nadando no quadrante alvo (QA) (B). * $p < 0,05$ vs. outros grupos em teste Newman-Keuls pós-ANOVA de uma via, ($n = 8-12$ por grupo).

5.3 Análise Histológica

De acordo com a análise histológica da região CA1 do hipocampo (Figura 10), quando comparados ao grupo NAIVE, os grupos SAL+VEH, SAL+CUR e SAL+APO e LPS+APO (Figuras 10-A, B, C, D e G, respectivamente) apresentaram lesões inflamatórias e necróticas menores do que os grupos LPS+VEH e LPS+CUR (Figuras 10-E e F, respectivamente).

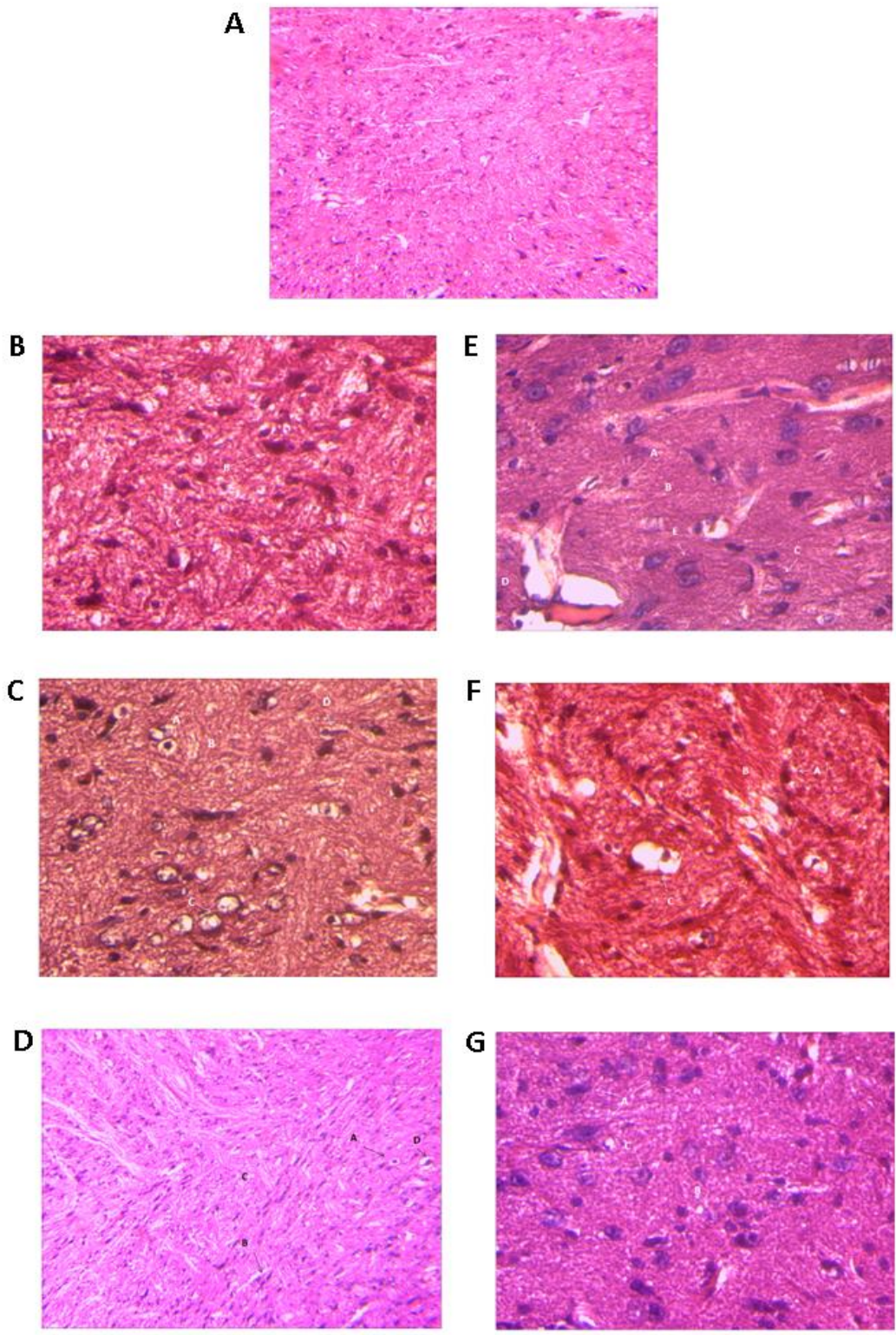


Figura 10: Lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina, representativas dos seguintes grupos: A – grupo NAIVE: Moderada degeneração neuronal com exsudação proteica difusa e discreta necrose e vacuolização com astrócito hipotróficos; B – grupo

SAL+VEH: Células de purkinje hipertróficas e vacuolizadas, necrose multifocal com exsudação proteica, oligodendrócitos hipertróficos e vacuolizados, astrócito hipotróficos; C – grupo SAL+CUR: Intensa astrocitose hipertrófica com presença de oligodendrócitos hipotróficos e neurônios hipertróficos e vacuolizados; D – grupo SAL+APO: Necrose e vacuolização multifocal, astrócitos hipertróficos, oligodendrocitos hipertróficos e vacuolizados, intensa hipertrofia e vacuolização neuronal; E – grupo LPS+VEH: Astrocitose hipertróficos, necrose e vacuolização multifocal, oligodendrocitos hipertróficos; F – grupo LPS+CUR: Necrose e vacuolização multifocal astrócitos hipertróficos, neurônios degenerados e vacuolizados; G – grupo LPS+APO: Necrose e vacuolização difusa, hemorragia multifocal de meninge, astrocitose hipotróficos, neurônios hipertróficos com intensa vacuolização. Magnificação de 40x.

CAPÍTULO 6: DISCUSSÃO

6.1 Modelo de neuroinflamação aguda

O modelo de neuroinflamação aguda implementado no presente trabalho, baseado no trabalho prévio de Deng, X. H. et al.⁽⁴²⁾, foi exitoso em seus dois objetivos iniciais: causar déficit cognitivo duradouro, verificável em uma tarefa de aprendizado de memória espacial, e lesões histológicas condizentes com um processo inflamatório agudo, verificável por análise histológica. Já foi demonstrado que a infusão de LPS no parênquima central causa ativação e hipertrofia astrocística e microglial, e pode induzir a produção de várias moléculas pró-inflamatórias e citocinas, incluindo IL-1, IL-6, TNF e NO⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁸⁾.

Há um robusto conjunto de trabalhos mostrando que a neuroinflamação pode reger o progresso patológico da doença de Alzheimer⁽⁴⁸⁾, explicando de que forma o acúmulo extracelular de peptídeo A β pode desencadear morte celular cumulativa. Por isso, decidimos escolher estabelecer em nosso laboratório este modelo, para posterior triagem de substâncias que possam atuar como neuroprotetoras neste cenário neuroinflamatório. Tais substâncias, se encontradas, podem ter grande utilidade terapêutica em uma abordagem diferente de doenças neurodegenerativas como a de Alzheimer, pois agirão sobre um componente até então pouco explorado, que é o neuroinflamatório neste contexto⁽¹⁰⁹⁾.

Ainda, optamos por implementar um modelo de inflamação aguda em vez de crônica. Muitas evidências apontam para a participação de processos inflamatórios crônicos na fisiopatologia da doença de Alzheimer, porém os efeitos mais lesivos para o tecido nervoso são aqueles consequentes de uma inflamação aguda⁽¹¹⁰⁾. Além disso, processos inflamatórios crônicos em algum momento iniciam como agudos para depois cronificarem⁽¹¹¹⁾. Assim, agindo farmacologicamente em um cenário de consequências decorrentes de uma inflamação aguda, podemos estar agindo sobre os gatilhos iniciais de uma cadeia de eventos citotóxicos mais difíceis de serem revertidos em etapas subsequentes.

No presente modelo de neuroinflamação aguda, observamos uma curva dose-resposta, de forma que a dose de 10 µg/lado intra-hipocampal, apesar de causar danos significativos no parênquima hipocampal (não mostrado), não causou danos em extensão suficiente para que os ratos apresentassem déficit cognitivo na retenção de memória espacial de longo prazo na tarefa do labirinto aquático de Morris (Figura 7). O prejuízo mnemônico só foi verificado em uma dose maior de LPS administrada intra-hipocampo, de 40 µg/lado. É importante ressaltar que o treino e o teste foram realizados 32 dias após a infusão intra-hipocampal de salina ou LPS, dando assim tempo para que processos plásticos regenerativos default pudessem agir reparando parte dos danos, bem como ter dado tempo de outras regiões neuronais próximas às áreas lesadas terem sido cooptadas para assumirem a responsabilidade funcional outrora concentrada na região lesada⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾.

6.2 Curcumina

A inibição da formação e agregação de peptídeo A β encontra-se sem dúvida entre as estratégias mais racionais utilizadas para tratar a DA, partindo-se da premissa, fortemente respaldada por vários trabalhos⁽¹⁰⁹⁾, que a placa β -amilóide é o componente chave para desencadear AD patogênese. Uma atenção considerável tem sido atraída para o potencial terapêutico de vários compostos polifenólicos derivados de plantas, tais como a curcumina, extrato de chá e *gingko biloba*. Porém, apesar de indícios de que a curcumina é uma droga com grande potencial anti-inflamatório e antiamiloidogênico, em nosso estudo isso não pode ser observado.

A baixa biodisponibilidade da curcumina é uma grande desvantagem, o que dificulta o seu desenvolvimento como agente terapêutico eficaz. Ao longo dos anos, uma extensa pesquisa tem mostrado a baixa biodisponibilidade curcumina in vivo, quando administrada por via oral, incluindo a baixa absorção, baixos níveis séricos, alta taxa de metabolismo e depuração sistêmica rápida, tanto em modelos humanos quanto animais^(115, 116). Por outro lado, quando administrada intravenosamente pela veia caudal durante uma semana (7,5 mg/kg/dia), a curcumina atravessou a BBB (barreira hematoencefálica), ficou retida na vizinhança das placas senis, e subsequentemente agiu para simultaneamente reduzir 30% do tamanho das placas e prevenir a formação de novas placas β -amiloide⁽¹¹⁷⁾.

Um relativamente elevado número de estudos mostraram que as concentrações plasmáticas de curcumina administrados por via oral ou via intraperitoneal foram muito baixas, tipicamente na ordem de nanomolar. O primeiro estudo sobre a biodisponibilidade, distribuição e excreção da curcumina utilizando ratos Spague-Dawley foi mostrado em 1978 por Wahlstrom e Blennow⁽¹¹⁵⁾. Concluiu-se que o teor de curcumina no plasma sanguíneo do rato foi insignificante mesmo que um excesso de quantidade de curcumina (até 1 g/kg) tenha sido administrada por via oral. Mais do que 75% da curcumina administrada foram excretadas nas fezes, enquanto traços foram encontrados na urina, o que indiretamente mostrou que o intestino (ceco) de rato teve uma capacidade de absorção bem pobre de curcumina. Além disso, não foram observados efeitos secundários aparentes nos ratos, apesar das doses elevadas (5 g/kg) que foram administradas⁽¹¹⁸⁾.

6.3 Apocinina

Considerando-se o efeito deletério da produção descontrolada de EROs, muitas substâncias têm sido estudadas como inibidores de enzimas responsáveis direta ou indiretamente pela produção desses EROs. Dentre esses inibidores, destaca-se a apocinina, inibidora de um grande produtor intracelular desses compostos reativos, a NADPH-oxidase⁽¹¹⁹⁾. A geração de EROs e a liberação de citocinas podem ser suprimidas pela apocinina, a qual também apresenta propriedades tipicamente relacionadas aos antiinflamatórios não-esteroidais, ou seja, inibição da formação dos mediadores lipídicos

da inflamação. Inúmeros trabalhos mostram que a apocinina é um inibidor eficiente do complexo NADPH-oxidase. O modo de ação desta molécula não é totalmente conhecido e parece estar relacionado ao impedimento da agregação dos componentes da enzima⁽⁸³⁾.

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, a apocinina parece ter revertido o déficit no desempenho cognitivo na retenção de memória de longo prazo causado pelo LPS aos animais, uma vez que o grupo LPS+APO obteve um resultado similar ao dos grupos controles.

Este achado é compatível com o mecanismo de ação da apocinina (descrito no item 2.3), que ao inibir a atividade na NADPH-oxidase, provavelmente inibiu os efeitos tardios do feedback positivo de ativação microglial disparado pela ação do LPS^(120, 121), desta forma contribuindo para que o prosseguimento dos eventos após o quadro de inflamação aguda seguissem majoritariamente o caminho da resolução e limpeza tecidual, ao invés do caminho de ativação microglial continuada que acabaria convergindo para lesão tecidual local (Figura 10G).

Diferente da curcumina, estudos mostram que a apocinina administrada por via oral pode atingir uma concentração elevada dentro do parênquima do sistema nervoso central para mitigar os níveis neurotóxicos de EROs⁽¹²²⁾. Por causa da baixa toxicidade e falta geral de efeitos colaterais, a apocinina é um candidato terapêutico atrativo para os pacientes humanos que sofrem de doenças neurodegenerativas⁽⁷⁴⁾.

Em animais com sepse, segundo Hernandez et al., o tratamento com apocinina na fase aguda da septicemia impede o desenvolvimento de disfunção cognitiva a longo prazo nos sobreviventes⁽¹²³⁾.

Na indução de lesão cerebral difusa na qual se tem um aumento da expressão de oxidase nicotinamida (NOX) que produz EROs, o tratamento com apocinina não só reduziu a atividade e expressão de NOX como também os déficits de aprendizagem espacial foram atenuados, conforme mensurado o desempenho no labirinto aquático de Morris⁽¹²⁴⁾.

Por outro lado, há estudos mostrando que animais tratados com apocinina apresentaram prejuízo na aprendizagem espacial. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores sobre inibidores farmacológicos de NADPH-oxidase, bem como com os estudos que utilizaram camundongos mutantes que são geneticamente deficientes na expressão neuronal de NADPH-oxidase, que demonstraram que esta enzima está envolvida na potenciação a longo prazo (LTP). Esses resultados indicam que a NADPH-

oxidase pode ser uma fonte de superóxido que é necessário para o funcionamento normal do cérebro⁽¹²⁵⁾.

Desta forma, faz-se necessário mais estudos pra averiguar qual a extensão do efeito neuroprotetor da apocinina aqui verificado, bem como por quais mecanismos bioquímicos ela exerce este efeito.

CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES

1) O modelo de neuroinflamação aguda foi implementado com sucesso, tendo sido verificado déficit na retenção de memória espacial de longa duração nos animais que receberam infusão intra-hipocampal bilateral de LPS na dose de 40 µg/lado. Ainda, verificou-se em uma análise histológica qualitativa a presença de lesões parenquimatosas inflamatórias em maior extensão na região hipocampal deste grupo de ratos, quando comparados com os grupos NAIVE e com os grupos que receberam infusão intra-hipocampal de salina apenas.

2.1) Dos fármacos aqui avaliados, apenas a apocinina, na dose de 50 mg/kg/dia, administrada por via oral durante 30 dias, conseguiu reverter o déficit mnemônico tardio apresentado no grupo que sofreu neuroinflamação. A curcumina foi inefetiva.

2.2) Ainda, o tratamento crônico com apocinina também amenizou a extensão das lesões parenquimatosas causadas pela neuroinflamação desencadeada pelo LPS intra-hipocampal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sperling RA, *et al.* (2010) Functional alterations in memory networks in early Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine* 12(1):27-43.
2. Wang X, *et al.* (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1842(8):1240-1247.
3. Braak H & Braak E (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of aging* 16(3):271-278; discussion 278-284.
4. Hardy J & Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(5580):353-356.
5. Goedert M & Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314(5800):777-781.
6. Semighini EP (2015) In Silico Design of Beta-Secretase Inhibitors in Alzheimer's Disease. *Chemical biology & drug design* 86(3):284-290.
7. Selkoe DJ (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Annals of internal medicine* 140(8):627-638.
8. Heneka MT & O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology* 184(1-2):69-91.
9. Walsh DM & Selkoe DJ (2004) Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein and peptide letters* 11(3):213-228.
10. Bertram L & Tanzi RE (2008) Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature reviews. Neuroscience* 9(10):768-778.
11. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, & Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(5):a006270.
12. Zhang YW & Xu H (2007) Molecular and cellular mechanisms for Alzheimer's disease: understanding APP metabolism. *Current molecular medicine* 7(7):687-696.
13. Nunan J & Small DH (2000) Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS letters* 483(1):6-10.
14. Tanzi RE (2005) The synaptic Abeta hypothesis of Alzheimer disease. *Nature neuroscience* 8(8):977-979.

15. Lockrow JP, Fortress AM, & Granholm AC (2012) Age-related neurodegeneration and memory loss in down syndrome. *Current gerontology and geriatrics research* 2012:463909.
16. Rovelet-Lecrux A, *et al.* (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature genetics* 38(1):24-26.
17. Folch J, *et al.* (2015) Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating beta-amyloid protein. *Neurologia*.
18. Akiyama H, *et al.* (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 21(3):383-421.
19. Tan J, *et al.* (1999) Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* 286(5448):2352-2355.
20. Abbas N, *et al.* (2002) Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. *Journal of neuroimmunology* 126(1-2):50-57.
21. Brown GC & Bal-Price A (2003) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Molecular neurobiology* 27(3):325-355.
22. Block ML, Zecca L, & Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience* 8(1):57-69.
23. Liu B & Hong JS (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304(1):1-7.
24. Gonzalez-Scarano F & Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience* 22:219-240.
25. McGeer EG & McGeer PL (2007) The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease. *CNS drugs* 21(10):789-797.
26. Nishioku T, *et al.* (2010) Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *Journal of pharmacological sciences* 112(2):251-254.
27. Takata K & Kitamura Y (2012) Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: tangle formation, amyloid-

- beta, and microglia in Alzheimer's disease. *Journal of pharmacological sciences* 118(3):331-337.
28. Minghetti L & Levi G (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Progress in neurobiology* 54(1):99-125.
 29. Suk K & Ock J (2012) Chemical genetics of neuroinflammation: natural and synthetic compounds as microglial inhibitors. *Inflammopharmacology* 20(3):151-158.
 30. Suk K (2005) Regulation of neuroinflammation by herbal medicine and its implications for neurodegenerative diseases. A focus on traditional medicines and flavonoids. *Neuro-Signals* 14(1-2):23-33.
 31. Ojha RP, Rastogi M, Devi BP, Agrawal A, & Dubey GP (2012) Neuroprotective effect of curcuminoids against inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 7(3):609-618.
 32. Barger SW & Harmon AD (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388(6645):878-881.
 33. Smith-Swintosky VL, *et al.* (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *Journal of neurochemistry* 63(2):781-784.
 34. Hewett SJ, Csernansky CA, & Choi DW (1994) Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13(2):487-494.
 35. Morimoto K, Murasugi T, & Oda T (2002) Acute neuroinflammation exacerbates excitotoxicity in rat hippocampus in vivo. *Experimental neurology* 177(1):95-104.
 36. Tancredi V, *et al.* (2000) The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *Journal of neurochemistry* 75(2):634-643.
 37. Murray CA & Lynch MA (1998) Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced

- impairments in long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(8):2974-2981.
38. Wang Q, Rowan MJ, & Anwyl R (2004) Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(27):6049-6056.
 39. Mori K, Togashi H, Ueno KI, Matsumoto M, & Yoshioka M (2001) Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following transient cerebral ischemia. *Behavioural brain research* 120(2):159-168.
 40. Boublay N, Schott AM, & Krolak-Salmon P (2016) Neuroimaging correlates of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a review of 20 years of research. *European journal of neurology*.
 41. Gotz J & Ittner LM (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature reviews. Neuroscience* 9(7):532-544.
 42. Deng XH, *et al.* (2012) Lipopolysaccharide induces paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) expression, synaptic alteration, and learning-memory deficit in rats. *Neuroscience* 209:161-170.
 43. D'Hooge R & De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research. Brain research reviews* 36(1):60-90.
 44. Da Silva WC, *et al.* (2008) Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus* 18(1):29-39.
 45. Calabrese V, *et al.* (2007) Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochemical research* 32(4-5):757-773.
 46. Kahles T, *et al.* (2007) NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38(11):3000-3006.
 47. Chandasana H, *et al.* (2015) Pharmacokinetic, bioavailability, metabolism and plasma protein binding evaluation of NADPH-oxidase inhibitor apocynin using

- LC-MS/MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 985:180-188.
48. Heneka MT, *et al.* (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology* 14(4):388-405.
 49. Rajendran L, *et al.* (2008) Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science* 320(5875):520-523.
 50. Ransohoff RM & Engelhardt B (2012) The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature reviews. Immunology* 12(9):623-635.
 51. Warren HS, *et al.* (2010) Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *The Journal of infectious diseases* 201(2):223-232.
 52. Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, & Tsirka SE (2013) Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PloS one* 8(2):e56293.
 53. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, & Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiological reviews* 91(2):461-553.
 54. McGeer PL & McGeer EG (2004) Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 10 Suppl 1:S3-7.
 55. McGeer PL & McGeer EG (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 23(4):474-483.
 56. Nathan C, *et al.* (2005) Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *The Journal of experimental medicine* 202(9):1163-1169.
 57. Emerit J, Edeas M, & Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 58(1):39-46.
 58. Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, & Cummings JL (2005) A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 2(2):131-136.
 59. Lao CD, *et al.* (2006) Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC complementary and alternative medicine* 6:10.

60. Lee WH, *et al.* (2013) Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Current neuropharmacology* 11(4):338-378.
61. Prasad KN & Bondy SC (2014) Inhibition of early upstream events in prodromal Alzheimer's disease by use of targeted antioxidants. *Current aging science* 7(2):77-90.
62. Cole GM, Teter B, & Frautschy SA (2007) Neuroprotective effects of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology* 595:197-212.
63. Mishra S & Palanivelu K (2008) The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology* 11(1):13-19.
64. Abe Y, Hashimoto S, & Horie T (1999) Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacological research* 39(1):41-47.
65. Lev-Ari S, Maimon Y, Strier L, Kazanov D, & Arber N (2006) Down-regulation of prostaglandin E2 by curcumin is correlated with inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human colon carcinoma cell lines. *Journal of the Society for Integrative Oncology* 4(1):21-26.
66. Menon VP & Sudheer AR (2007) Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology* 595:105-125.
67. Rathore P, *et al.* (2008) Curcuma oil: reduces early accumulation of oxidative product and is anti-apoptogenic in transient focal ischemia in rat brain. *Neurochemical research* 33(9):1672-1682.
68. Yang F, *et al.* (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *The Journal of biological chemistry* 280(7):5892-5901.
69. Lim GP, *et al.* (2001) The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(21):8370-8377.
70. Singh S & Aggarwal BB (1995) Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *The Journal of biological chemistry* 270(42):24995-25000.

71. Begum AN, *et al.* (2008) Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326(1):196-208.
72. Lin CF, Yu KH, Jheng CP, Chung R, & Lee CI (2013) Curcumin reduces amyloid fibrillation of prion protein and decreases reactive oxidative stress. *Pathogens* 2(3):506-519.
73. Petronio MS, Zeraik ML, Fonseca LM, & Ximenes VF (2013) Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules* 18(3):2821-2839.
74. Stefanska J & Pawliczak R (2008) Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of inflammation* 2008:106507.
75. Hart BA, Simons JM, Knaan-Shanzer S, Bakker NP, & Labadie RP (1990) Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin. *Free radical biology & medicine* 9(2):127-131.
76. Lafeber FP, *et al.* (1999) Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38(11):1088-1093.
77. Zhang Y, *et al.* (2005) Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *American journal of hypertension* 18(7):910-916.
78. Costa CA, *et al.* (2009) Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. *American journal of hypertension* 22(12):1242-1249.
79. Ximenes VF, Kanegae MP, Rissato SR, & Galhiane MS (2007) The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Archives of biochemistry and biophysics* 457(2):134-141.
80. Touyz RM (2008) Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. *Hypertension* 51(2):172-174.
81. Heumuller S, *et al.* (2008) Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 51(2):211-217.
82. Babior BM (2000) Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine* 109(1):33-44.

83. Barbieri SS, *et al.* (2004) Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free radical biology & medicine* 37(2):156-165.
84. Qin L, *et al.* (2004) NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *The Journal of biological chemistry* 279(2):1415-1421.
85. Wilkinson BL, *et al.* (2012) Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 33(1):197 e121-132.
86. Block ML & Hong JS (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology* 76(2):77-98.
87. Cain DP & Saucier D (1996) The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances. *Reviews in the neurosciences* 7(3):215-231.
88. O'Keefe J (1990) A computational theory of the hippocampal cognitive map. *Progress in brain research* 83:301-312.
89. O'Keefe J & Conway DH (1978) Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Experimental brain research* 31(4):573-590.
90. Kubie JL & Muller RU (1991) Multiple representations in the hippocampus. *Hippocampus* 1(3):240-242.
91. Rolls ET (2000) Memory systems in the brain. *Annual review of psychology* 51:599-630.
92. Poucet B, Save E, & Lenck-Santini PP (2000) Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Reviews in the neurosciences* 11(2-3):95-111.
93. Burgess N, Donnett JG, & O'Keefe J (1998) The representation of space and the hippocampus in rats, robots and humans. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 53(7-8):504-509.
94. Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, & Zinyuk L (1997) Place cells and place navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(1):343-350.
95. Redish AD & Touretzky DS (1998) The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural computation* 10(1):73-111.
96. de Hoz L, Martin SJ, & Morris RG (2004) Forgetting, reminding, and remembering: the retrieval of lost spatial memory. *PLoS biology* 2(8):E225.

97. Schimanski LA & Nguyen PV (2004) Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: a focus on inbred mouse strains. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28(5):463-483.
98. Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 11(1):47-60.
99. Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain research. Cognitive brain research* 3(3-4):167-181.
100. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, & O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297(5868):681-683.
101. Moser E, Moser MB, & Andersen P (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(9):3916-3925.
102. Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, & Morris RG (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(21):9697-9701.
103. Menendez-Gonzalez M, de Celis Alonso B, Salas-Pacheco J, & Arias-Carrion O (2015) Structural Neuroimaging of the Medial Temporal Lobe in Alzheimer's Disease Clinical Trials. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 48(3):581-589.
104. Patil CS, *et al.* (2003) Protective effect of flavonoids against aging- and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. *Pharmacology* 69(2):59-67.
105. Glezer I, Lapointe A, & Rivest S (2006) Innate immunity triggers oligodendrocyte progenitor reactivity and confines damages to brain injuries. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(6):750-752.
106. Herber DL, *et al.* (2006) Diverse microglial responses after intrahippocampal administration of lipopolysaccharide. *Glia* 53(4):382-391.
107. Tanaka S, *et al.* (2006) Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *Journal of neuroscience research* 83(4):557-566.
108. Beurel E & Jope RS (2009) Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *Journal of neuroinflammation* 6:9.

109. Selkoe DJ (2013) The therapeutics of Alzheimer's disease: where we stand and where we are heading. *Annals of neurology* 74(3):328-336.
110. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, & Ma D (2014) Neuroinflammation: the role and consequences. *Neuroscience research* 79:1-12.
111. Da Mesquita S, *et al.* (2016) Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: The crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 68:547-562.
112. Schwartz M, Kipnis J, Rivest S, & Prat A (2013) How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33(45):17587-17596.
113. Xiong XY, Liu L, & Yang QW (2016) Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Progress in neurobiology* 142:23-44.
114. Hagan MA, Rosa MG, & Lui LL (2016) Neural plasticity following lesions of the primate occipital lobe: The marmoset as an animal model for studies of blindsight. *Developmental neurobiology*.
115. Wahlstrom B & Blennow G (1978) A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta pharmacologica et toxicologica* 43(2):86-92.
116. Cheng AL, *et al.* (2001) Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer research* 21(4B):2895-2900.
117. Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, & Bacskai BJ (2007) Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *Journal of neurochemistry* 102(4):1095-1104.
118. Holder GM, Plummer JL, & Ryan AJ (1978) The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 8(12):761-768.
119. Williams HC & Griendling KK (2007) NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? *Journal of cardiovascular pharmacology* 50(1):9-16.
120. Jekabsone A, Mander PK, Tickler A, Sharpe M, & Brown GC (2006) Fibrillar beta-amyloid peptide A β 1-40 activates microglial proliferation via stimulating

- TNF-alpha release and H₂O₂ derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *Journal of neuroinflammation* 3:24.
121. Choi SH, Aid S, Kim HW, Jackson SH, & Bosetti F (2012) Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. *Journal of neurochemistry* 120(2):292-301.
 122. Trumbull KA, *et al.* (2012) Diapocynin and apocynin administration fails to significantly extend survival in G93A SOD1 ALS mice. *Neurobiology of disease* 45(1):137-144.
 123. Hernandez MS, *et al.* (2014) The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *Journal of neuroinflammation* 11:36.
 124. Song SX, *et al.* (2013) Attenuation of brain edema and spatial learning deficits by the inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin following diffuse traumatic brain injury in rats. *Molecular medicine reports* 7(1):327-331.
 125. Kishida KT, *et al.* (2006) Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease. *Molecular and cellular biology* 26(15):5908-5920.