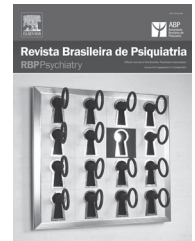




Revista Brasileira de Psiquiatria

RBP Psychiatry

Official Journal of the Brazilian Psychiatric Association
Volume 34 • Supplement 2 • October/2012



ARTIGO

Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer

Andréa S. Torrão,¹ Cecília C. Café-Mendes,¹ Caroline C. Real,¹ Marina S. Hernandez,¹ Ana F. B. Ferreira,¹ Taisa O. Santos,¹ Gabriela P. Chaves-Kirsten,¹ Caio H. Y. Mazucanti,² Emer S. Ferro,³ Cristoforo Scavone,² Luiz R. G. Britto¹

¹ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil

² Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil

³ Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil

DESCRITORES

Neurodegeneração;
Neuroproteção;
Estresse oxidativo;
Estreptozotocina;
NADPHoxidase.

Resumo

Os transtornos neurodegenerativos são, sem dúvida, um problema crescente nas ciências da saúde, dado o aumento da expectativa de vida e de estilos de vida pouco saudáveis. Embora os mecanismos de tais doenças ainda estejam longe de ser esclarecidos, vários estudos que derivam tanto da ciência básica quanto de abordagens clínicas contribuíram nessa direção. Na presente revisão, são discutidas linhas de frente da pesquisa básica sobre as doenças de Parkinson e Alzheimer, em que grupos de pesquisas de três departamentos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo estão envolvidos em um esforço multidisciplinar. O foco principal desta revisão envolve os modelos animais desenvolvidos para se estudar os aspectos celulares e moleculares daquelas doenças neurodegenerativas, incluindo o estresse oxidativo, a sinalização da insulina e as análises proteômicas, dentre outros. Antecipamos que esta revisão irá auxiliar o grupo a determinar as futuras direções da pesquisa conjunta nessa área e, o mais importante, estabelecer o nível de cooperação que planejamos desenvolver juntamente com colegas do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada que estão envolvidos com pesquisa clínica na mesma área.

Correspondência para: Luiz R. G. Britto. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, CEP: 05508-900. São Paulo, SP, Brasil. Telefone: (+55 11) 3091-7242, Fax: (+55 11) 3091-7426.

E-mail: britto@icb.usp.br

1516-4446 - ©2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

doi:10.1016/j.rbp.2012.08.004

Introdução

Esta revisão aborda as duas doenças neurodegenerativas mais comuns, as doenças de Parkinson e Alzheimer, com destaque para alguns aspectos relacionados às hipóteses etiológicas e terapêuticas sob uma perspectiva da pesquisa básica. Sob esse aspecto, discutimos principalmente um modelo animal bem estabelecido da doença de Parkinson. Também mencionamos um modelo animal recém-proposto para a doença de Alzheimer, que também tem sido objeto de pesquisas em nossos laboratórios.

A doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson em "An assay on the shaking palsy",¹ é a segunda doença degenerativa mais comum e afeta cerca de 1-2% da população acima de 60 anos e até seis milhões de pessoas no mundo todo.² A doença é clinicamente caracterizada por disfunções motoras, tais como tremor em repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural, devido ao decréscimo de estímulos dopaminérgicos no estriado, como resultado da degeneração neuronal da substância nigra pars compacta (SNc), em uma taxa de cerca de 5% ao ano. Além disso, há distúrbios cognitivos e vegetativos.³ A redução de dopamina nos núcleos da base induz uma redução da ativação talâmica, o que resulta em uma inibição excessiva das respostas motoras.⁴ O déficit motor se manifesta após 40-60% da perda neuronal dopaminérgica e dos níveis de dopamina no estriado.⁵

Além da degeneração neuronal da SNc, há também uma perda neuronal progressiva em algumas outras regiões do cérebro, tais como o tronco encefálico, o lócus cerúleo, o núcleo reticular do tronco encefálico e o núcleo motor dorsal do vago, bem como no núcleo basal de Meynert, na amígdala e na região CA2 do hipocampo. Outra característica da doença é a presença de inclusões conhecidas como corpos de Lewy ou neuritos de Lewy, dependendo de sua localização (citoplasma vs. processos neuronais), que são basicamente compostos de α -sinucleína. Essas inclusões proteicas são causadas por uma falha no sistema de degradação da célula e são compostas por agregados normais de proteína, proteínas truncadas e por proteínas com alterações conformacionais, além da ubiquitina.^{2,6} A α -sinucleína pertence à família de proteínas compostas por α , β e γ -sinucleínas - amplamente expressas no cérebro -, com funções fisiológicas incertas, mas aparentemente tendo uma função na neurotransmissão, tal como a regulação do tamanho das vesículas sinápticas e dos processos de reciclagem e plasticidade.⁷

Os déficits cognitivos foram deixados de lado durante alguns anos; no entanto, afetam quase 60% dos pacientes com DP⁸ e isso pode se devido aos corpos de Lewy.⁹ Além disso, aproximadamente 40% dos pacientes com DP exibem sintomas de ansiedade e depressão¹⁰, bem como déficit de memória decorrente das alterações no circuito fronto-estriado-talâmico após a diminuição de dopamina¹¹ e a morte de neurônios noradrenérgicos no lócus cerúleo.^{12,13}

A 6-hidroxidopamina como modelo animal da doença de Parkinson

Como a neurodegeneração nigroestriatal foi reconhecida como uma característica patológica típica da DP, pesquisas

sobre a patogênese da doença têm se apoiado no desenvolvimento de modelos animais que reproduzam a perda de neurônios dopaminérgicos na SNc. O primeiro modelo animal da DP foi gerado em 1968, quando Ungerstedt demonstrou que, com a injeção da 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no estriado ou na SNc, era possível depletar o conteúdo da dopamina nos terminais nervosos e nos corpos celulares, respectivamente.¹⁴ Desde então, para se estudar a DP, foram desenvolvidos vários outros modelos animais que empregam compostos diferentes capazes de gerar lesões dopaminérgicas seletivas acompanhadas de sintomas parkinsonianos, tais como o contaminante da heroína 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), pesticidas (rotenona, paraquat e maneb), lipopolissacarídeo e manganês.¹⁵ No entanto, o modelo da 6-OHDA é ainda o mais usado para gerar lesões nigroestriatais.¹⁶

A 6-OHDA é um análogo hidrolizado da dopamina encontrado no cérebro de pacientes portadores da DP.¹⁷ Como a neurotoxina não cruza a barreira hematoencefálica, ela é diretamente injetada no sistema nervoso central, especificamente no estriado, na SNc ou até no feixe prosencefálico medial. Como resultado de sua captação pelos transportadores noradrenérgicos e da dopamina, a 6-OHDA destrói de forma seletiva os sistemas catecolaminérgicos e promove uma perda de neurônios dopaminérgicos, parecida com a da DP, que se inicia imediatamente após a injeção, tornando-se estável após duas semanas.^{18,19} A injeção da 6-OHDA na porção central-lateral do estriado é o modelo animal que mais se assemelha à doença humana^{20,21}, já que gera uma lenta evolução dos sintomas e parece ser mais apropriado para estudos que foquem estratégias terapêuticas.¹⁶

Os efeitos da 6-OHDA estão principalmente relacionados ao grande estresse oxidativo causado pela toxina que, uma vez acumulada no citosol, parece ser auto-oxidada e promove uma alta taxa de geração de radicais livres²¹ e a interrupção da cadeia respiratória mitocondrial (complexos I e IV).^{1,21} A oxidação da 6-OHDA gera diretamente o peróxido de hidrogênio e o superóxido, ambos fundamentais para a propagação da oxidação, e as paraquinonas, que parecem tornar inativas enzimas cruciais, como a catecol-O-metiltransferase e a tirosina hidroxilase.²² Além disso, a oxidação da 6-OHDA está associada à produção do radical hidroxil, um poderoso agente oxidante que pode reagir a uma taxa elevada com moléculas orgânicas e inorgânicas.²³

Associados à análise molecular e neuroquímica, os testes de comportamento geralmente são empregados para avaliar a extensão do local da lesão por 6-OHDA naquele modelo animal. Um teste clássico aplicado aos ratos com lesão unilateral da via nigroestriatal é o comportamento rotacional induzido pela apomorfina agonista da dopamina, que induz rotação do lado oposto ao lesado.¹⁶

NADPH oxidase e doença de Parkinson

As NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase) oxidases (Nox) constituem uma família de enzimas de múltiplas subunidades que transferem elétrons pelas membranas biológicas e produzem superóxido pela redução de um único elétron do oxigênio molecular. Todas as sete isoformas da Nox descritas até agora (Nox1-5 e Duoxes 1-2) contêm ao menos seis domínios transmembranas e os domínios citosólicos FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e de

ligação NADPH. Cada membro da família Nox apresenta componentes citosólicos, mecanismos de ativação, localizações subcelulares e distribuição de tecido específicos.²⁴ A Nox2 foi a primeira isoforma a ser descoberta e ainda representa a isoforma mais estudada de Nox, sendo essencial para a defesa natural do hospedeiro. É composta de subunidades localizadas na membrana celular (p22^{phox} e gp91^{phox} - formando o citocromo b558, uma flavoproteína heterodimérica) e no citoplasma (p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}). A ativação da proteína G de baixo peso molecular (Rac1 ou Rac2) e a fosforilação de p47^{phox} iniciam a migração de elementos citoplasmáticos para a membrana plasmática, onde se associam ao citocromo b558 e geram a enzima funcional. O elétron do NADPH citoplasmático se desloca primeiro para a FAD, depois para os grupos heme Nox e, finalmente, pela membrana e é transferido para o oxigênio.²⁵ De forma similar à Nox2, a Nox1 interage com p22^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} ou seus homólogos, NoxO1 e NoxA1, respectivamente. A ativação da Nox3 é menos definida, mas parece envolver a Rac, a p47^{phox} e a NoxA1. A Nox4 é constitutivamente ativa e requer apenas p22^{phox}. A Nox5 e as duoxes são reguladas pelo cálcio por meio dos domínios EF-hand no citosol.²⁶ Dentre as isoformas da Nox descritas no tecido nervoso estão Nox1, Nox2, Nox 3 e Nox4.^{27,28} No entanto, a Nox2 parece exercer um papel predominante nas doenças neurodegenerativas.

Sob condições fisiológicas, as espécies reativas do oxigênio (ERO) derivadas da Nox são moléculas de sinalização que influenciam muitos processos fisiológicos. No entanto, diversos estudos que usaram modelos animais e cérebros de humanos *post-mortem* verificaram o aumento da ativação das proteínas Nox em uma grande variedade de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a DP, mas os mecanismos envolvidos ainda são pouco compreendidos. Revisamos aqui os estudos mais recentes quanto à ativação da Nox no modelo da PD induzida por 6-OHDA. A maioria dos dados foi obtida por meio de observações *in vitro* e indica um grande envolvimento da Nox2 na neurotoxicidade dopaminérgica. Por exemplo, foi demonstrado em culturas primárias mesencefálicas que a 6-OHDA induziu um aumento significativo da imunomarcagem da gp91^{phox} e p47^{phox}, o que indica maior ativação da Nox2. A ativação microglial e a geração de O₂ nos neurônios dopaminérgicos também foram significativamente reduzidas pela apocinina, um inibidor da Nox.²⁹ Usando o mesmo modelo *in vitro*, os mesmos autores também mostraram um aumento significativo dos níveis do mRNA da gp91^{phox} e da p47^{phox}, 12 horas após o tratamento celular com a 6-OHDA.³⁰ Em outro estudo, foi mostrado que a 6-OHDA também induziu um aumento da expressão da gp91^{phox} nas células dopaminérgicas do neuroblastoma humano.³¹ Esses resultados estão em consonância com as nossas observações *in vivo*. De fato, os níveis de proteína da membrana da p67^{phox} foram bastante elevados na SNpc de camundongos com lesão por 6-OHDA, o que sugere a ativação da Nox2. A imunomarcagem da tirosina hidroxilase indicou que os animais nocautes para gp91^{phox} parecem estar protegidos da perda de células dopaminérgicas na SNc e da perda dos terminais dopaminérgicos no estriado. Além disso, camundongos do tipo selvagem tratados com apocinina e camundongos nocautes para gp91^{phox} exibiram um comportamento rotacional induzido pela apomorfina significativamente melhor após a lesão por 6-OHDA. Dessa forma, apesar das EROs derivadas da

auto-oxidação e da contribuição dos mecanismos de inibição mitocondrial para a neurodegeneração dopaminérgica no modelo da DP induzida pela 6-OHDA, de modo geral os dados acima indicam que as ERO derivadas da NOx estão também bastante envolvidas no modelo da DP.

A doença de Parkinson e os efeitos neuroprotetores do exercício

Exercício e estimulação comportamental podem acionar processos de plasticidade no sistema nervoso. Dados com animais mostraram que o exercício pode aumentar a sobrevivência neuronal e a resistência a lesões cerebrais, promover a angiogênese e a neurogênese, melhorar a aprendizagem e contribuir para a função cognitiva no processo de envelhecimento.³² Assim, muitos concordam que uma possível neuroproteção pode ser alcançada por meio de exercícios físicos.

Já foi mostrado que exercícios físicos estão inversamente relacionados a doenças neurodegenerativas, porque contribuem para o processo funcional que envolve a recuperação, manutenção e prevenção contra danos cerebrais em animais e humanos.^{33,34} Estudos com modelos animais da DP com o emprego de paradigmas distintos de exercício têm tentado explicar os mecanismos moleculares das mudanças induzidas por exercício na fisiopatologia da DP, uma vez que a extensão da lesão e o tipo de exercício (voluntário ou forçado) podem afetar o grau de neuroproteção e de melhoria comportamental.^{33,34} Esses estudos demonstraram angiogênese,³⁵ aumento de respostas anti-inflamatórias e diminuição de agentes inflamatórios e melhoria das funções mitocondriais,³⁸ na neurogênese no estriado³⁹ e na SNc.⁴⁰

As respostas da plasticidade melhoram os déficits neuroquímicos, especialmente os níveis da tirosina hidroxilase, e ambos os sintomas cognitivo e motor.^{37-39,41,42} Por exemplo, o exercício na esteira durante 30 minutos, por 14 dias consecutivos, para ratos submetidos ao modelo da 6-OHDA da DP, é capaz de melhorar a expressão da tirosina hidroxilase no estriado e na SNc e o desempenho motor no teste de rotação com apomorfina.⁴¹ Por outro lado, exercícios voluntários feitos nas rodas giratórias que se iniciaram duas e meia semanas antes da infusão intracerebral da 6-OHDA em ratos, e que continuaram até quatro semanas após a infusão da neurotoxina, melhoraram o desempenho do animal nos testes comportamentais relacionados à assimetria dos membros anteriores sem mudanças no transportador da dopamina e da tirosina hidroxilase.⁴²

Além dos dados derivados dos modelos animais, estudos clínicos mostraram uma melhoria do controle motor e do equilíbrio dependentes de exercício, o que resulta na diminuição da frequência de quedas dos pacientes e na melhoria da qualidade de vida e do modo de andar.^{33,34,43}

É possível que os efeitos de neuroproteção que o exercício induz no modelo da 6-OHDA em ratos, descritos acima, sejam promovidos por neurotrofinas, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF).^{38,39} De fato, Nguyen e col.⁴⁴ mostraram que o BDNF tem efeitos de neuroproteção contra um estímulo neurotóxico *in vitro* que ativa as vias de apoptose. Os dados *in vivo* obtidos por meio do protocolo de exercícios feitos na esteira durante quatro semanas antes da injeção do lipopolissacarídeo (LPS) em ratos mostraram que o exercício preveniu por completo a perda de neurônios dopaminérgicos induzida

pelo LPS, a redução dos níveis de dopamina e a disfunção motora, bem como recuperou a sinalização do BDNF reduzida pelo LPS.³⁷ Ademais, o bloqueio do receptor do BDNF aboliu a proteção induzida pelo exercício contra a perda neuronal da dopamina induzida pelo LPS. Ainda, o BDNF é capaz de ativar indiretamente as enzimas oxidantes e, então, diminuir os danos oxidativos induzidos pela 6-OHDA.^{1,45}

A doença de Parkinson e o sistema canabinoide

O sistema canabinoide consiste de compostos endógenos lipofílicos, tais como o N-araquidonoil etanolamina (anandamida) e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG), suas enzimas sintéticas e de degradação e os receptores CB₁ e CB₂. Acredita-se que a maioria dos principais efeitos canabinoides é mediada pelos receptores CB₁, que apresentam localização pré-sináptica predominante, o que sugere a sinalização retrógrada nos terminais axônicos por meio da modulação da liberação do neurotransmissor. Mais recentemente, também foi mostrado que os canabinoides podem se ligar a outros receptores, tais como o receptor de potencial transitório do tipo valinóide 1 (TRPV1)⁴⁶ e o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) da família dos receptores nucleares.⁴⁷

O receptor CB₁ é um dos receptores metabotrópicos mais abundantes no sistema nervoso central⁴⁸ que são, em especial, encontrados em grandes quantidades nos núcleos da base,⁴⁹ localizados nos terminais dos neurônios que empregam o GABA e dos neurônios glutamatérgicos. Altas densidades do CB₁ são observadas no estriado, nos globos pálidos interno e externo e na substância nigra pars reticulata (SNpr).⁵⁰ Além disso, os endocanabinoides, a anandamida e o 2-AG estão bastante concentrados no estriado.⁴⁹

Na última década, se deu muita atenção ao envolvimento do sistema canabinoide em várias patologias, já que se verificou que os elementos constitutivos desse sistema são alterados em numerosas patologias, tanto no sistema nervoso central quanto na periferia.⁵¹ No sistema nervoso, o sistema canabinoide também estava envolvido nos processos de morte/sobrevivência.⁵² Nesse contexto, alguns grupos concentraram os esforços para compreender a relação entre a DP e o sistema canabinoide, o que levou a perspectivas para as terapias canabinoides.

Um estudo recente com seres humanos mostrou um decréscimo acentuado do CB₁ na SN de pacientes com DP, concomitante ao ligeiro aumento nas áreas de projeção dopaminérgica.⁵³ Estudos com modelos da 6-OHDA da DP também reforçam a ideia de variação na expressão do CB₁, bem como na concentração de canabinoides endógenos nos núcleos da base. Por exemplo, os níveis da expressão do mRNA do receptor CB₁ aumentaram no estriado de ratos 7-10 semanas após a injeção unilateral de 6-OHDA, embora nenhuma mudança significativa tenha sido encontrada na ligação do receptor CB₁.⁵⁴ Por outro lado, um estudo mais recente mostrou um decréscimo do receptor CB₁ na SNpr apenas quando a 6-OHDA era injetada no estriado, e não no feixe prosencefálico medial.⁵⁵ Em contraste, Casteels *et al.*⁵⁶ não observaram quaisquer mudanças na expressão do CB₁ na SN após a injeção da 6-OHDA. Os resultados heterogêneos podem depender do local da injeção da 6-OHDA ou, mais importante, dos períodos analisados após a lesão.⁵⁷

Foram observados níveis mais altos de anandamida em ratos injetados com 6-OHDA, acompanhados por uma redução

da enzima que metaboliza endocanabinoides (principalmente anandamida), a amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) e o transportador da anandamida.⁵⁸ Além disso, um estudo com a linhagem celular PC12 exposta à 6-OHDA e tratada com anandamida descreveu um efeito de neuroproteção independente de CB₁.⁵⁹ Foi sugerido, por exemplo, que a melhora do tônus endocanabinoide produz um efeito antidiscinesia induzida por levodopa no modelo da 6-OHDA.⁶⁰

Canabinoides exógenos também demonstraram um potencial efeito de neuroproteção e, mais recentemente, foi dada atenção especial às propriedades antioxidantes descritas para alguns compostos canabinoides. Por exemplo, o $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol (THC), o principal constituinte psicoativo da *Cannabis*, promove a redução da morte de neurônios dopaminérgicos e reverte o decréscimo na transmissão dopaminérgica nos núcleos da base de ratos lesionados pela 6-OHDA.⁶¹ O mesmo estudo observou um efeito de neuroproteção do canabidiol, atribuído às propriedades antioxidantes. Outro estudo sustenta a ideia de que apenas os canabinoides com propriedades antioxidantes, tais como AM 404, diferente daqueles com afinidade aos receptores canabinoides, reduzem a toxicidade causada pela 6-OHDA.⁶² Não se pode excluir, no entanto, a participação dos receptores CB₂ nos efeitos de proteção observados no modelo da 6-OHDA com uma indução/regulação positiva desses receptores, principalmente na micróglia reativa, o que pode contribuir para propriedades de neuroproteção do sistema canabinoide nos distúrbios dos núcleos da base.⁶¹

Sendo assim, independentemente dos resultados heterogêneos, e algumas vezes conflitantes, descritos acima, parece que o sistema canabinoide exerce uma função nos mecanismos compensatórios que neutralizam o desequilíbrio na fisiologia dos núcleos da base que ocorrem na DP.⁵⁰

A doença de Parkinson, proteômica e peptidômica

Apesar dos mecanismos já identificados envolvidos na DP, tais como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, agregados anormais da proteína, falhas no sistema ubiquitina-proteassoma, proliferação glial, respostas inflamatórias e assim por diante, o diagnóstico da doença ainda depende do aparecimento dos sintomas. Nesse contexto, os marcadores biológicos são de grande interesse para o diagnóstico precoce e a prevenção - um campo que tem sido explorado com o uso da abordagem proteômica.^{2,63}

Em um estudo proteômico da DP no líquido cefalorraquidiano, observou-se que a Apo A-I, reguladora do metabolismo lipídico e possivelmente da agregação proteica nos corpos de Lewy, estava regulada negativamente em pacientes com PD em comparação aos grupos controle.⁶⁴ Outro estudo que usa o modelo de drosófila da DP com a expressão da α -sinucleína A53T destacou a importância da α -sinucleína no transporte da membrana e na biogênese da membrana sináptica. Além disso, a Hsc3p (heat shock protein cognate 3) que regula o enovelamento e a degradação de proteínas, também aumentou, o que indica maiores concentrações de proteínas mal enoveladas e, conseqüentemente, leva ao estresse do retículo endoplasmático.⁶⁵ Em um estudo proteômico no modelo da DP em ratos injetados com 6-OHDA, mostrou-se que mais de 70 proteínas estavam alteradas no estriado e na SN. Algumas dessas proteínas alteradas incluem a 14-3-3 beta/alfa (Ywhab; regulada positivamente) e outras

reguladas negativamente, tais como a calretinina (Calb2), a NADH desidrogenase 1 alfa (NDUFA10), a isoenzima ubiquitina carbóxi-terminal hidrolase L3 (UCHL3) e a proibitina.⁶⁶ A proibitina está conectada às subunidades do complexo mitocondrial I, em particular à subunidade NDUFS3 (NADH-ubiquinona oxidoreductase 30kDa), que está envolvida com mecanismos de senescência e atua protegendo subunidades do complexo I antes da sua formação. Ensaios de coimunoprecipitação demonstraram interação entre a proibitina e a NDUFS3 e estudos imuno-histoquímicos demonstraram que elas estão elevadas em neurônios dopaminérgicos em fase de morte celular. Além disso, a ausência da proibitina nas células SH-SY5Y induziu morte celular pela 6-OHDA. Todos esses dados sugerem seu potencial papel na regulação da função mitocondrial em células dopaminérgicas.⁶⁶

Outra abordagem que usa o modelo da 6-OHDA revelou cinco proteínas alteradas: α B-cristalina, gama-enolase, guanidoacetato metiltransferase, vinculina e subunidade α -2 do proteossoma. Essas proteínas estão relacionadas ao aumento das discinesias induzidas por L-DOPA, um efeito colateral provocado pelo uso crônico de L-DOPA no tratamento da DP.⁶⁷

A eletroforese bidimensional, em combinação com o estudo MALDI-TOF MS com o uso do método em ratos hemiparkinsonianos induzido por 6-OHDA, revelou proteínas reguladas positivamente: APLP2 (*amyloid precursor-like protein 2*), cininogênio, glucocinase (GK), TMBR (*tropomyosin alpha chain, type brain-1*) e cadeia leve da calpactina I. A APLP2 apresentou um aumento de 5,35 vezes duas semanas pós-lesão. Essa proteína desapareceu da SNc após a lesão induzida pela 6-OHDA e aumentou nos neurônios estriados positivos para APLP2, o que pode indicar sua presença nos neurônios pré e pós-sinápticos do sistema nigroestriatal.⁶⁸ Essa descoberta sugere o papel dessa proteína na sinaptogênese e/ou reorganização das sinapses no estriado. Os autores também discutem que o aumento da APLP2 pode ser o resultado de um número maior de células que expressam a proteína (neurogênese) ou de uma diferenciação desses neurônios na resposta ao dano.⁶⁸

Os peptídeos exercem um papel importante nos transtornos neurológicos e são considerados bons biomarcadores. No modelo 6-OHDA da DP com ratos, a discinesia induzida pela L-DOPA foi relacionada aos níveis de Dyn B (dinorfina B) e aNeo (alfa-neoendorfina) na SN. A análise por *MALDI-imaging* revelou que o metabólito da dinorfina Tyr-Gly-Gly-Phen-Leu-Arg estava alto e as intensidades dos picos de Dyn B estavam baixas na SN, onde há alta especificidade de ligação para os receptores delta opioides.⁶⁹

O PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) age como um neurotransmissor e um neuromodulador e está presente na amígdala, no tálamo e na medula espinhal. O PACAP revelou ter efeitos de neuroproteção no modelo de ratos induzidos pela 6-OHDA e diminuiu a perda neuronal dopaminérgica em 50%, bem como preveniu a hipocinesia por causa da neurotoxicidade da 6-OHDA.⁷⁰ Outro peptídeo importante é o VIP (*vasoactive intestinal peptide*), que apresenta potentes efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiapoptóticos. Efeitos benéficos também já foram demonstrados na função motora, provavelmente por causa de níveis maiores de GABA no tálamo. O VIP reduz a peroxidação lipídica, a fragmentação do DNA e a produção de NO.⁷¹

Dessa forma, o papel dos peptídeos nos transtornos neurológicos como a doença de Parkinson se tornou um campo de pesquisa proeminente que poderia ser cuidadosamente investigado na procura de marcadores biológicos.

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a causa principal da demência em idosos e está associada ao dano progressivo nas funções cerebrais, que incluem a memória, a linguagem, a orientação espacial, o comportamento e a personalidade. Estima-se que haja atualmente 36 milhões de portadores de DA no mundo todo e prevê-se que esse número aumente drasticamente nas próximas décadas.⁷² A DA é uma patologia multifatorial e cerca de 99% dos casos apresentam uma ocorrência esporádica (DAE), em oposição à forma menos comum da doença hereditária,⁷³ com a idade avançada sendo o principal fator de risco. Outros fatores de risco importantes são os parâmetros vasculares e metabólicos que compreendem a chamada “síndrome metabólica”, tais como a dislipidemia e a hipertensão, bem como a hiperglicemia. Além disso, o diabetes *melittus* tipo II está associado a maior risco de DA e de demência vascular.⁷⁴

Clinicamente, a DA se caracteriza pela perda progressiva de memória e pelo declínio da função cognitiva e culmina na morte prematura do indivíduo, em média 10 anos após o diagnóstico.⁷² Ademais, a DA vem acompanhada de sintomas neuropsiquiátricos não cognitivos, que incluem ansiedade, agressão, delírio, excitação ou apatia, desinibição ou depressão.⁷⁵ Índícios neuropatológicos característicos da DA incluem perda neuronal, acúmulos de emaranhados neurofibrilares (NFT) correspondentes aos depósitos intracelulares da proteína Tau hiperfosforilada e das fibras distróficas e a expressão aumentada e o processamento anormal da proteína precursora de beta-amiloide (APP), o que leva ao depósito do peptídeo beta-amiloide (AB) e, portanto, à formação das placas senis.⁷³ Outro indicio de DA é a angiopatia amiloide cerebral. De fato, a disfunção cerebrovascular pode preceder o declínio cognitivo e o início da DA. A hipoperfusão cerebral e a eliminação alterada do AB através da barreira hematoencefálica podem contribuir para o início e a progressão da demência característica da DA. Há também evidências da importância do papel da micróglia nesses processos patológicos.⁷⁶

Embora a DA seja multifatorial, sua etiologia ainda é desconhecida. Apesar de muitos estudos sugerirem que o peptídeo AB (“hipótese da cascata amiloide”) pode iniciar a patogênese da DA ou contribuir para ela, os mecanismos pelos quais ele provoca perda neuronal e as anormalidades da Tau ainda são pouco esclarecidos. Dessa forma, nos últimos anos, várias outras novas hipóteses surgiram a fim de contribuir para o conhecimento de processos neurodegenerativos da DA. Abaixo, descrevemos brevemente dados recentes relativos à DA, com o foco nos papéis da sinalização da insulina e dos transtornos do metabolismo da glicose como possíveis fatores na etiologia da DA.

Deficiência mitocondrial, sinalização de Ca²⁺ e a doença de Alzheimer

Apesar de mais de 20 anos terem sido dedicados à “hipótese da cascata amiloide”, muitas outras hipóteses permanecem como possíveis causas do início e da progressão da DA, como

o estresse oxidativo, a proteína Tau, o príon e as causas ambientais.⁷⁷ Alguns autores acreditam que a DA se inicia por uma deficiência de enzimas do ciclo ácido tricarbóxico, atividade reduzida da citocromo oxidase e dano do DNA mitocondrial. A produção das espécies reativas de oxigênio, por exemplo, parece estar envolvida no surgimento e na manutenção do ciclo de degeneração da DA, o que agrava o dano do DNA mitocondrial e altera outros complexos da cadeia de transporte do elétron, que leva à maior produção das espécies reativas.⁷⁸

Os déficits de aprendizagem e memória no início da DA também podem ser o resultado de alterações da sinalização de Ca^{2+} . Os oligômeros do peptídeo AB aumentam a entrada de Ca^{2+} e mais Ca^{2+} é lançado no retículo endoplasmático. O aumento de Ca^{2+} no retículo, sensibiliza os receptores de rianodina (RyR), que, por sua vez, lançam mais Ca^{2+} dos estoques internos. Há evidências de que as mutações que ocorrem na DA podem induzir as mudanças da sinalização de Ca^{2+} . Outra observação é que as espinhas e os dendritos dos neurônios piramidais neocorticais que estão próximos aos depósitos de AB apresentaram níveis mais altos de Ca^{2+} em repouso. No entanto, ainda permanece a dúvida sobre o que ocorre primeiro: a ativação da via amiloidogênica ou as mudanças na sinalização do Ca^{2+} .⁷⁹

Sinalização da insulina, deficiência do metabolismo da glicose e doença de Alzheimer

Estudos funcionais mostraram distúrbios tanto na mobilização da glicose quanto no metabolismo energético, seja precedendo ou acompanhando os estágios iniciais dos danos cognitivos na DAE.⁸⁰⁻⁸¹

Evidências moleculares levantaram hipóteses de que o tráfego da proteína precursora do amiloide (APP) está sob controle da sinalização da insulina e do receptor da insulina tirosina quinase^{82,83} e que a insulina regula a fosforilação da proteína Tau via a atividade de glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3).^{84,85} Além disso, a insulina afeta as funções cerebrais, tais como a cognição e a memória, conforme mostrado em estudos *in vivo*.⁸⁵ Consequentemente, o dano do metabolismo da glicose e da sinalização da insulina tem sido considerado como uma possível etiologia da DAE.⁸⁶ A insulina afeta várias funções cerebrais, que incluem a cognição, a memória e a plasticidade sináptica por meio das vias de sinalização do receptor de insulina (RI). A insulina se liga à subunidade extracelular de seu receptor, o que resulta na autofosforilação e na ativação da subunidade- β intracelular. O receptor ativado da insulina fosforila alguns substratos intracelulares, que incluem o substrato do receptor da insulina. A fosforilação de substratos intracelulares, então, leva ao recrutamento e à ativação de múltiplas proteínas e à iniciação de algumas cascatas de sinalização; dentre as mais abundantes estão a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) e as vias de sinalização da proteína quinase ativada pelo mitógeno (MAPK).⁸⁶⁻⁸⁸ A ativação da via de PI3K, por sua vez, medeia a ativação da Akt quinase de serina-teorina (também conhecida como proteína quinase-B, PKB) e promove a sobrevivência neuronal ao inativar diretamente a maquinaria pró-apoptótica.⁸⁹ Ademais, a PI3K/Akt ativada fosforila e, portanto, inibe ambas as formas citosólicas de glicogênio sintase quinase 3 (GSK3),⁹⁰ que é conhecida por regular a formação do peptídeo AB. Dessa forma, a

insulina regula a secreção de APP solúvel por meio da via dependente de PI3K.⁹¹

Alguns estudos confirmaram que o metabolismo cerebral diminui antes da deterioração das funções cognitivas, o que sugere que a falha de energia seja uma das indicações reversíveis mais precoces da DAE.⁹² Foram encontradas na DAE^{93,94} anormalidades predominantes no metabolismo da glicose no cérebro e seu controle pelo sistema de transdução do sinal da insulina nos neurônios, o que leva à hipótese de que a DAE é a diabetes mellitus do tipo II no cérebro.⁹² Propôs-se que a falta de combinação entre a ação da insulina e a função do receptor da insulina, que inclui vias de sinalização a jusante, estaria envolvida na disfunção do sistema cerebral da insulina na DAE.⁹⁵

Injeção intraventricular cerebral da estreptozotocina como um modelo para Doença de Alzheimer esporádica

Considerando a presença da insulina e de seus receptores no cérebro, foi desenvolvido um modelo experimental com ratos com o uso da estreptozotocina (STZ) para induzir a disfunção do sistema de insulina no cérebro.⁹³ A STZ (glicosamina derivada da nitrosourea) é uma droga seletivamente tóxica para células de secreção/produção de insulina e é usada para induzir tanto a diabetes mellitus (DM) dependente da insulina quanto a não dependente, após a administração intravenosa ou intraperitoneal em ratos.⁹⁶ Pequenas doses da injeção intracerebroventricular da estreptozotocina (icvSTZ) não alteram, no entanto, os níveis de glicose no plasma e não induzem DM, mas alteram o metabolismo da glicose no cérebro.⁹⁷ Considerando a importância dos papéis da insulina e dos receptores da insulina no cérebro, e o fato de que a deficiência de insulina e a resistência estão relacionadas tanto à DAE quanto à DM, muitos autores consideram icvSTZ como um modelo para a DAE.^{74,94,97,98}

Na periferia, a toxicidade da STZ se inicia quando essa droga é absorvida pelas células B pancreáticas via o transportador de glicose GLUT2 e induz a morte da célula pela alquilação do DNA e a ativação da poli-ADP ribosilação.⁹⁹ Como a STZ é doadora de óxido nítrico (NO), a participação de NO no efeito citotóxico da STZ também foi observada, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio, que também contribuem para a fragmentação do DNA e evocam outras mudanças deletérias. A ação da STZ na mitocôndria resulta na formação de ânions superóxido, na inibição do ciclo do ácido tricarbóxico e no decréscimo substancial do consumo de oxigênio pela mitocôndria, limitando fortemente a produção de ATP mitocondrial.⁹⁶ O mecanismo de ação da STZ no sistema nervoso, no entanto, ainda não está totalmente elucidado.

Os achados moleculares e comportamentais que se seguem a alteração do metabolismo da glicose e da sinalização da insulina parecem mimetizar a DAE, pelo menos em alguns aspectos. Aqui apresentamos um breve resumo dos resultados obtidos até agora por autores que estudam ratos injetados com icvSTZ. Os resultados indicam alterações semelhantes às observadas em pacientes portadores de DA. Em geral, a administração icv da STZ é associada a mudanças comportamentais, moleculares e morfológicas em animais.

Conforme mencionado anteriormente, as principais indicações da DA são a formação de placas senis por causa do acúmulo de AB e a formação de NFT por causa da hiperfosforilação de Tau.⁷³ Em muitas regiões do cérebro de ratos injetados com STZ, há um aumento da fosforilação de Tau,^{83,87,88,100} dos emaranhados neurofibrilares⁸⁰ e da expressão do peptídeo AB,^{80,86,100} embora esses estudos não relatem a formação de placas senis.

Corroborando as indicações patológicas mencionadas antes, dados comportamentais têm sido bastante consistentes ao mostrar déficits cognitivos e aprendizagem e memória de curto e longo prazo comprometidas após a administração icv de STZ. Por exemplo, os déficits de memória foram observados no labirinto aquático de Morris apenas três horas após a injeção e persistiram por até 30 dias.¹⁰⁰ Também se mostrou que a injeção da STZ leva a comprometimentos cognitivos nas tarefas de memória, o que inclui a esQUIVA passiva e o labirinto em cruz elevado,¹⁰¹⁻¹⁰³ que parecem ser independentes de quantas injeções ou de quantas doses de STZ foram administradas.⁸⁶ Há, no entanto, alguns estudos que demonstram que doses menores resultam em um déficit cognitivo menor.¹⁰⁴

Embora o sistema colinérgico seja descrito como um dos primeiros a serem afetados na DA,⁷³ uma semana após uma única injeção icv de STZ nenhuma mudança foi observada quanto ao número ou à morfologia dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, dos núcleos septais mediais, da banda diagonal, do núcleo basal magnocelular ou do hipocampo.¹⁰⁵ Além disso, a colina acetiltransferase (ChAT) não variou em algumas áreas do cérebro mesmo um mês após a injeção.¹⁰⁰ No entanto, houve um aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE)^{86,105} e uma redução da atividade ChAT,^{106,107} o que pode explicar a função sináptica e a habilidade de aprendizagem reduzidas e os déficits de memória observados nesses animais.¹⁰² Outros sistemas de neurotransmissores também parecem ser modificados no modelo icv de STZ. Por exemplo, há um *down-regulation* do receptor da dopamina D1 e uma *up-regulation* da subunidade α -1 do receptor GABA-A.¹⁰⁸

Os marcadores para a apoptose são aumentados no modelo icv da STZ e percebe-se uma atrofia de oligodendrócitos, provavelmente devida à diminuição da densidade celular observada na região periventricular e à inflamação resultante.⁸⁶ Além disso, muitos autores descreveram uma maior expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), principalmente nas regiões peri e paraventricular, no septo, fórnix, estriado e hipocampo.^{100,105} Também há um alargamento do terceiro ventrículo após a injeção da STZ, condizente com a hipótese da perda neuronal.¹⁰⁹

Considerando as proteínas relativas ao metabolismo da glicose e a via de sinalização da insulina, foi observado no modelo icv de STZ um decréscimo da expressão de substrato do receptor de insulina 1 e 2, AKT/PKB, do transportador da glicose do tipo (GLUT1), GLUT3 e GSK-3 β , que também é notado em pacientes portadores de DAE.^{86,87} Além disso, após a administração da STZ, ocorreram anomalias graves no metabolismo da glicose/energético,¹¹⁰ como a redução do uso da glicose em 17 áreas do cérebro. Finalmente, as atividades das principais enzimas glicolíticas diminuíram muito após a injeção icv da STZ.¹¹¹

Dessa forma, o metabolismo energético e o comprometimento da sinalização da insulina, a redução da atividade da

ChAT e o aumento da atividade da AChE podem fazer parte da base biológica para a redução acentuada da capacidade de aprendizagem e memória, bem como para o aumento dos indícios da DA no modelo icv de STZ.¹⁰² São necessários, no entanto, mais estudos para se compreenderem por completo os efeitos da STZ no sistema nervoso central. Os eventos que disparam a neurodegeneração da DA ainda precisam ser elucidados por completo, de modo a gerar um modelo adequado para essa devastadora doença multifatorial.

O modelo da estreptozotocina intraventricular cerebral e as abordagens terapêuticas

O estresse oxidativo contribui de maneira importante para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, conforme demonstrado anteriormente nesta revisão (por favor, consulte a seção *NADPH oxidase e a doença de Parkinson*). Mecanismos semelhantes também parecem fazer parte da etiologia da DA.¹¹² Alguns desses danos oxidativos incluem a peroxidação lipídica e a degradação proteica, o que leva a alterações na atividade enzimática e causa o rompimento da membrana celular e, por fim, a morte da célula.

Um dos tratamentos em desenvolvimento para a DA é o uso da curcumina. A *curcuma* (*Curcuma Longa* L.) apresenta 3-5% de curcuminoides, incluindo 50-60% de curcumina, e também óleos e resina (cerca de 5%). A curcumina é composta de dois monômeros do ácido ferúlico e apresenta propriedades depuradoras de radicais livres.¹¹³ Em contraste com os níveis elevados de radicais livres induzidos pela injeção icv de STZ em ratos, a curcumina foi capaz de conter esse processo e também a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase no hipocampo e no córtex cerebral. O tratamento induziu a atividade das enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione redutase (GR), e também aumentou os níveis da glutathione reduzida (GSH) e da glutathione oxidada (GSSG) em ambas as estruturas do cérebro. Além disso, o tratamento também agiu contra os níveis reduzidos de acetilcolina induzida pela injeção de STZ, o que também contribuiu para melhorar a memória e os déficits de aprendizagem.¹⁰¹

Outros estudos avaliaram as influências do tratamento com curcumina no metabolismo do glicogênio e da glicose, que estão notavelmente reduzidos no modelo da STZ no córtex cerebral e no hipocampo, o que inclui níveis menores dos RI. A injeção intraperitoneal da curcumina em ratos melhorou o desempenho da tarefa de esQUIVA passiva e o teste do labirinto aquático de Morris e aumentou os níveis da IGF-1 nessas estruturas cerebrais. A IGF-1 tem sido relacionada à fosforilação da tau e o seu dano leva à hiperfosforilação da tau e, conseqüentemente, à disfunção mitocondrial e à morte celular.¹¹⁴ Corroborando esses dados, o tratamento oral com curcumina recuperou os níveis de RI em ambas as estruturas, bem como o desempenho da memória comportamental e nos testes de aprendizagem.¹¹⁵ Outros estudos com as células SHSY5Y demonstraram o papel da curcumina na ativação da via de sinalização da Wnt/ β -catenina por meio da inibição de GSK-3 β , que é responsável pela fosforilação da β -catenina e também exerce a função de substrato da β -catenina.

Ademais, a curcumina induz a expressão da β -catenina e da ciclina D1. Todas essas sinalizações cruzadas da via interferem na quantidade da PS1 (presenilina 1) livre e, conseqüentemente, na atividade da γ -secretase que envolve

a clivagem de APP.¹¹⁶ Outro extrato de planta, a *Centella asiatica* (Umbelliferae), também apresentou efeitos similares à curcumina.¹¹⁷

As vias de sinalização da Wnt e da MAP quinase também estão envolvidas em outras abordagens que usam protocolos de exercício, que são benéficos para a doença de Parkinson, conforme demonstrado anteriormente nesta revisão (por favor, consulte a seção *A doença de Parkinson e os efeitos neuroprotetores do exercício*). Foram empregados estudos semelhantes no modelo da STZ na DAE. A corrida na esteira (durante cinco semanas) conteve de forma significativa o declínio cognitivo observado na tarefa do labirinto aquático. Provavelmente, esse efeito é devido a alterações nas vias de sinalização semelhantes à insulina e também nas vias da MAP quinases e Wnt.¹¹⁸ As MAP quinases exercem um papel importante na sinalização neurotrófica e na plasticidade sináptica¹¹⁹ e Wnt também está envolvida na plasticidade, memória, neurogênese e LTP.¹²⁰

Um estudo recente usou um flavonoide denominado rutina, que mostrou efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, como a supressão da ativação micróglial.¹²¹ O mesmo estudo demonstrou a atenuação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que indica o dano lipídico e também outros efeitos benéficos que envolvem as enzimas GPx, GR e catalase induzidas pelo estresse oxidativo. Os efeitos anti-inflamatórios foram demonstrados pela diminuição da translocação nuclear da produção de NF- κ B, de IL-8 e dos neurônios imunorreativos GFAP e COX-2.¹²¹ No mesmo campo de pesquisa, as estatinas são usadas para avaliar os efeitos de intervenções anti-inflamatórias e antioxidativas na DA. Foi usado um modelo conjugado celecoxib/STZ para testar a pitavastatina (3-hidróxi-3-metil glutaril coenzima A [HMG-CoA]), o inibidor da redutase e o donepezil (um inibidor da colinesterase) e esses tratamentos apresentaram resultados bem-sucedidos na neuroproteção.¹²²

A doença de Alzheimer, proteômica e peptidômica

Os peptídeos também se mostraram importantes na doença de Alzheimer. Recentemente, a somatostatina foi associada ao início da doença, uma vez que a formação das placas de β -amiloide danifica a transmissão do neuropeptídeo. As placas de β -amiloide são alvos-chave para a enzima degradante da insulina (EDI), são reguladas pela presença da somatostatina e funcionam como um substrato e um modulador alostérico para a enzima.¹²³ Outro peptídeo é a substância P (SP), que apresenta um efeito na via proteolítica da proteína precursora do amiloide (APP) por causa do aumento da atividade de α -secretase e da menor disponibilidade de APP para β -secretases.¹²⁴

Além disso, as peptidases também são importantes para a geração do β -amiloide. Evidências crescentes demonstram a importância da neprilisina na liberação do β -amiloide por causa da diminuição do nível dessa enzima com o avanço da idade.¹²⁵ Ademais, há níveis elevados de peptidases, tais como a endopeptidase EP 24.15¹²⁶ e a prolil oligopeptidase (POP), no hipocampo de ratos tratados com AB.¹²⁷ Também se mostrou que os níveis da EP 24.15 são maiores no tecido cerebral na DA em comparação aos controles e provavelmente agem também na liberação desse peptídeo.¹²⁸

Há um campo de pesquisa a ser explorado - denominado peptidômica - que envolve a identificação das alterações intracelulares de peptídeos, que não usa enzimas digestivas e analisa a forma nativa dos peptídeos e suas modificações pós-translacionais.^{129,130} Algumas delas são fragmentos de hemoglobina (seis da cadeia- α e três da cadeia β)¹³¹ chamados de hemorfinas (LVV hemorfina-7, VV hemorfina-7, LVV hemorfina-6 e VV hemorfina-6). Elas estão significativamente elevadas no lobo temporal na doença de Alzheimer, mas não nos lobos frontal, occipital ou hipocampo.¹³² Essas hemorfinas apresentam ações em receptores opioides.^{133,134}

Há também outros fragmentos da hemoglobina com funções intracelulares. São chamados de hemopressinas (cadeia $\alpha 1$ da hemoglobina) (PVNFKFLSH; HP) e apresentam um efeito hipotensivo.¹²⁶ Outros estudos demonstraram propriedades antinoceptivas sobre a dor inflamatória¹³⁵ e suas atividades sobre os receptores canabinoides CB₁ como um antagonista seletivo.¹³⁶ A hemopressina parece fazer parte da agora denominada via secretória não clássica de peptídeos caracterizada pela síntese "sob demanda" e pela ausência de armazenamento vesicular.¹³⁷ Esses dados revelam novos aspectos do sistema endocanabinoide, que apresenta papéis importantes nos transtornos neurodegenerativos, tais como a doença de Alzheimer.¹³⁸

Uma possível origem para esses peptídeos intracelulares parece ser o proteossoma. Estudos recentes conduzidos pelo nosso grupo com o uso da espectrometria de massa demonstraram que a inibição por epoximicina nas células HEK293T alterou significativamente a composição peptídica intracelular.¹³⁹ Resultados preliminares também demonstraram mudanças no perfil de peptídeos intracelulares, bem como na expressão do mRNA de algumas peptidases, tais como a EP24.15 e a aminopeptidase B (dados não publicados).

De modo geral, os dados indicam que esses peptídeos podem funcionar em alguns mecanismos celulares, o que inclui a modulação das interações proteína-proteína.^{140,141} A geração e a degradação naturais desses peptídeos intracelulares podem ser importantes para os mecanismos envolvendo transtornos neurológicos.

Conclusão

Os dados apresentados acima ilustram alguns dos recentes resultados de várias abordagens básicas voltadas para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas doenças de Parkinson e Alzheimer. Os modelos animais discutidos aqui são bastante úteis para esse propósito, além de outros modelos disponíveis, que incluem os ratos transgênicos. Algumas das abordagens discutidas aqui revelaram a relevância do estresse oxidativo, dos endocanabinoides, exercícios físicos/fatores neurotróficos e peptídeos como fontes de possíveis estratégias de neuroproteção, que ainda serão testadas em humanos. Espera-se que o ambiente multidisciplinar proporcionado pelo Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada estimule a expansão dessas ideias nos próximos anos.

Declarações

Andréa S. Torrão

Local de trabalho: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Cecilia C. Café-Mendes

Local de trabalho: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil

Caroline C. Real

Local de trabalho: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Marina S. Hernandez

Local de trabalho: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Ana F. B. Ferreira

Local de trabalho: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Taísa O. Santos

Local de trabalho: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Gabriela P. Chaves-Kirsten

Local de trabalho: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Caio H. Y. Mazucanti

Local de trabalho: Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Emer S. Ferro

Local de trabalho: Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Cristoforo Scavone

Local de trabalho: Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Luiz R. G. Britto

Local de trabalho: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

O trabalho desenvolvido nos laboratórios dos autores foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

* Modesta.

** Significativa.

*** Significativa. Montantes fornecidos à instituição do autor ou a colega para pesquisa onde o autor tem participação, não diretamente ao autor.

Referências

- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;65:135-72.
- Licker V, Kovari E, Hochstrasser DF, Burkhard PR. Proteomics in human Parkinson's disease research. *J Proteomics.* 2009;73:10-29.
- Vajda FJ. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci.* 2002;9:4-8.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res.* 1990;85:119-46.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodriguez M, Olanow CW. The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology.* 2000;55:S13-20 [discussion S21-13].
- Ferrer I. Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects. *Prog Neurobiol.* 2009;88:89-103.
- Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:57-87.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006;5:235-45.
- McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, Cummings J, Duda JE, Lippa C, Perry EK, Aarsland D, Araji H, Ballard CG, Boeve B, Burn DJ, Costa D, Del Ser T, Dubois B, Galasko D, Gauthier S, Goetz CG, Gomez-Tortosa E, Halliday G, Hansen LA, Hardy J, Iwatsubo T, Kalaria RN, Kaufer D, Kenny RA, Korczyn A, Kosaka K, Lee VM, Lees A, Litvan I, Londos E, Lopez OL, Minoshima S, Mizuno Y, Molina JA, Mukaetova-Ladinska EB, Pasquier F, Perry RH, Schulz JB, Trojanowski JQ, Yamada M. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology.* 2005;65:1863-72.
- Fernandez HH. Updates in the medical management of Parkinson disease. *Cleve Clin J Med.* 2012;79:28-35.
- Melo LM, Barbosa ER, Caramelli P. Declínio cognitivo e demência associados à doença de Parkinson: características clínicas e tratamento. *Rev Psiquiatr Clin.* 2007;34(4):176-83.
- Perez V, Sosti V, Rubio A, Barbanj M, Rodriguez-Alvarez J, Kulisevsky J. Modulation of the motor response to dopaminergic drugs in a parkinsonian model of combined dopaminergic and noradrenergic degeneration. *Eur J Pharmacol.* 2007;576:83-90.
- Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol.* 2003;60:337-41.
- Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 1968;5:107-10.
- Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012;279:1156-66.
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008;14(Suppl 2):S124-9.
- Jellinger K, Linert L, Kienzl E, Herlinger E, Youdim MB. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 1995;46:297-314.
- Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewing SE, Bankiewicz KS. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res.* 1989;494:285-93.
- Labandeira-Garcia JL, Rozas G, Lopez-Martin E, Liste I, Guerra MJ. Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway, as studied by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. *Exp Brain Res.* 1996;108:69-84.
- Tillerson JL, Cohen AD, Caudle WM, Zigmond MJ, Schallert T, Miller GW. Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. *J Neurosci.* 2002;22:6790-9.
- Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004;318:215-24.
- Przedborski S, Ischiropoulos H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:685-93.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997;272:18515-7.
- Cifuentes-Pagano E, Csanyi G, Pagano PJ. NADPH oxidase inhibitors: a decade of discovery from Nox2ds to HTS. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(14):2315-25.
- Touyz RM, Montezano AC. Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase. *Circ Res.* 2012;110:1159-61.
- Brown DI and Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(9):1239-53.
- Hernandes, MS, Britto LR, Real CC, Martins DO, Lopes LR. Reactive oxygen species and the structural remodeling of the visual system after ocular enucleation. *Neuroscience.* 2010;170(4):1249-60.

28. Chu, J., M. Tong, and S.M. de la Monte, Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons. *Acta Neuropathol.* 2007;113(6):659-73.
29. Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem.* 2007;103(1):145-56.
30. Rodriguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis.* 2008;31(1):58-73.
31. Lin YC, Uang HW, Lin RJ, Chen IJ, Lo YC. Neuroprotective effects of glyceryl nonivamide against microglia-like cells and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323(3):877-87.
32. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002;25(6):295-301.
33. Alonso-Frech F, Sanahuja JJ, Rodriguez AM. Exercise and physical therapy in early management of Parkinson disease. *Neurologist.* 2011;(6 Suppl 1):S47-53.
34. Hirsch MA, Farley BG. Exercise and neuroplasticity in persons living with Parkinson's disease. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2009;45(2):215-29.
35. Al-Jarrah M, Jamous M, Al Zailaey K, Bweir SO. Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/progressive mouse model of Parkinson's Disease. *NeuroRehabilitation.* 2010;26(4):369-73.
36. Cadet P, Zhu W, Mantione K, Rymer M, Dardik I, Reisman S, Hagberg S, Stefano GB. Cyclic exercise induces anti-inflammatory signal molecule increases in the plasma of Parkinson's patients. *Int J Mol Med.* 2003;12(4):485-92.
37. Wu SY, Wang TF, Yu L, Jen CJ, Chuang JI, Wu FS, Wu CW, Kuo YM. Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway. *Brain Behav Immun.* 2011;25(1):135-46.
38. Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci.* 2011;33(7):1264-74.
39. Tajiri, N.; Yasuhara, T.; Shingo, T *et al.*, Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Research.* 2010;200-7.
40. Steiner B, Winter C, Hosman K, Siebert E, Kempermann G, Petrus DS, Kupsch A. Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2006;199(2):291-300.
41. Yoon MC, Shin MS, Kim TS, Kim BK, Ko IG, Sung YH, Kim SE, Lee HH, Kim YP, Kim CJ. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. *Neurosci Lett.* 2007;423(1):12-7.
42. O'Dell SJ, Gross NB, Fricks AN, Casiano BD, Nguyen TB, Marshall JF. Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. *Neuroscience.* 2007;144(3):1141-51.
43. Goodwin VA, Richards SH, Taylor RS, Taylor AH, Campbell JL. The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and metaanalysis. *Mov Disord.* 2008;23(5):631-40.
44. Nguyen N, Lee SB, Lee YS, Lee KH, Ahn JY. Neuroprotection by NGF and BDNF Against Neurotoxin-Exerted Apoptotic Death in Neural Stem Cells Are Mediated Through Trk Receptors, Activating PI3-Kinase and MAPK Pathways. *Neurochem Res.* 2009;34(5):942-51.
45. Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron.* 2008;60(5):748-66.
46. Mechoulam R, Parker LA. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev Psychol.* 2012 [in press].
47. O'Sullivan SE, Kendall DA. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology.* 2010;215(8):611-6.
48. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-4.
49. Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol.* 1999;58(4):315-48.
50. van der Stelt M, Di Marzo V. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol.* 2003;480(1-3):133-50.
51. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(5):438-55.
52. Guzman M. Neurons on cannabinoids: dead or alive? *Br J Pharmacol.* 2003;140(3):439-40.
53. Van Laere K, Casteels C, Lunskens S, Goffin K, Grachev ID, Bormans G, Vandenberghe W. Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo. *Neurobiol Aging.* 2012;33(3):620,e1-8.
54. Romero J, Berrendero F, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernández-Ruiz JJ, de Yébenes JG, Ramos JA. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci.* 2000;66(6):485-94.
55. Walsh S, Mnich K, Mackie K, Gorman AM, Finn DP, Dowd E. Loss of cannabinoid CB1 receptor expression in the 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal terminal lesion model of Parkinson's disease in the rat. *Brain Res Bull.* 2010;81(6):543-8.
56. Casteels C, Lauwers E, Baitar A, Bormans G, Baekelandt V, Van Laere K. In vivo type 1 cannabinoid receptor mapping in the 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2010;1316:153-62.
57. Morera-Herreras T, Miguez C, Aristieta A, Ruiz-Ortega JA, Ugedo L. Endocannabinoid modulation of dopaminergic motor circuits. *Front Pharmacol.* 2012;3:110.
58. Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci.* 2002;22(16):6900-7.
59. Mnich K, Finn DP, Dowd E, Gorman AM. Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. *Int J Cell Biol.* 2010; 2010:[ID 818497].
60. Giuffrida A, McMahon LR. In vivo pharmacology of endocannabinoids and their metabolic inhibitors: therapeutic implications in Parkinson's disease and abuse liability. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010;91(3-4):90-103.
61. Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2005;19(1-2):96-107.
62. García-Arencibia M, González S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res.* 2007;1134(1):162-70.

63. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 2000;10:524-30.
64. Zhang X, Yin X, Yu H, Liu X, Yang F, Yao J, Jin H, Yang P. Quantitative proteomic analysis of serum proteins in patients with Parkinson's disease using an isobaric tag for relative and absolute quantification labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Analyst.* 2012;137:490-5.
65. Xun Z, Sowell RA, Kaufman TC, Clemmer DE. Quantitative proteomics of a presymptomatic A53T alpha-synuclein Drosophila model of Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7:1191-203.
66. Park B, Yang J, Yun N, Choe KM, Jin BK, Oh YJ. Proteomic analysis of expression and protein interactions in a 6-hydroxydopamine-induced rat brain lesion model. *Neurochem Int.* 2010;57:16-32.
67. Valastro B, Dekundy A, Krogh M, Lundblad M, James P, Danysz W, Quack G, Cenci MA. Proteomic analysis of striatal proteins in the rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem.* 2007;102:1395-409.
68. Shen Y, Yu Y, Guo H, Tang Z, Yu FS, Zhou J. Identification and comparative analysis of differentially expressed proteins in rat striatum following 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway: up-regulation of amyloid precursor-like protein 2 expression. *Eur J Neurosci.* 2002;16:896-906.
69. Ljungdahl A, Hanrieder J, Falth M, Bergquist J, Andersson M. Imaging mass spectrometry reveals elevated nigral levels of dynorphin neuropeptides in L-DOPA-induced dyskinesia in rat model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 2011;6:e25653.
70. Reglodi D, Lubics A, Tamas A, Szalontay L, Lengvari I. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2004;151:303-12.
71. Tuncel N, Korkmaz OT, Tekin N, Sener E, Akyuz F, Inal M. Antioxidant and anti-apoptotic activity of vasoactive intestinal peptide (VIP) against 6-hydroxy dopamine toxicity in the rat corpus striatum. *J Mol Neurosci.* 2012;46:51-7.
72. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329-44.
73. Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci.* 2004;29(6):427-41.
74. Biessels GJ, Kappelle LJ. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans.* 2005;33:1041-4.
75. Pinton S, da Rocha JT, Gai BM, Nogueira CW. Sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin promotes angiogenic behavior in mice. *Behav Brain Res.* 2011;223(1):1-6.
76. Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118(1):103-13.
77. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(Suppl 2):S265-79.
78. Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(Suppl 2):S357-67.
79. Berridge MJ. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Arch.* 2010;459(3):441-9.
80. de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005;7(1):45-61.
81. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis.* 2005;8(3):247-68.
82. Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, Xu H. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci.* 2001;21(8):2561-70.
83. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(6):288-93.
84. Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem.* 1997;272(40):25326-32.
85. Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.* 1992;314(3):315-21.
86. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007;72:217-33.
87. Correia SC, Santos RX, Perry G, Zhu X, Moreira PL, Smith MA. Insulin-resistant brain state: The culprit in sporadic Alzheimer's disease? *Aging Research Reviews.* 2011;10:264-73.
88. Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeia E, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: Major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Research.* 2012;1441:64-78.
89. Van der Heide LP, Ramakers GMJ, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Prog Neurobiol.* 2006;79:205-21.
90. Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated protein kinase. *Nature.* 2005;378:785-9.
91. Solano DC, Sironi M, Bonfini C, Solarte SB, Govoni S, Racchi M. Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway. *FASEB J.* 2000;14:1015-22.
92. Hoyer S. Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impacts of glucose/energy metabolism. *J. Neural Transm. Suppl.* 1998;54:187-94.
93. Hoyer S. The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. *J. Neural Transm.* 2002;109:341-60.
94. Hoyer S, Lannert H, Latteier E, Meisel T. Relationship between cerebral energy metabolism in parietotemporal cortex and hippocampus and mental activity during aging in rats. *J Neural Transm.* 2004;111:575-89.
95. Salkovic-Petrisic M, Lackovic Z. Intracerebroventricular administration of betacytotoxics alters expression of brain monoamine transporter genes. *J Neural Transm.* 2003;110:15-29.
96. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50:537-46.
97. Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signaling pathway. *J Neurochem.* 2006;96:1005-15.
98. Henneberg N, Hoyer S. Desensitization of the neuronal insulin receptor: a new approach in the etiopathogenesis of late-onset sporadic dementia of the Alzheimer type (SDAT)? *Arch Gerontol Geriatr.* 1995;21:63-74.

99. Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
100. Santos TO, Mazucanti CHY, Xavier GF, Torráo AS. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol Behav*. 2012 [in press].
101. Ishrat T, Parveen K, Hoda MN, Khan MB, Yousuf S, Ansari MA, Saleem S, Islam F: Effects of Pycnogenol and vitamin E on cognitive deficits and oxidative damage induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Behav Pharmacol* 2009;20(7):567-75.
102. Lannert H, Hoyer S: Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 1998;112(5):1199-208.
103. Veerendra Kumar MH, Gupta YK: Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(5-6):336-42.
104. Grünblatt E, Koutsilieri E, Hoyer S, Riederer P. Gene expression alterations in brain areas of intracerebroventricular streptozotocin treated rat. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3):261-71.
105. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology*. 2006;52:836-43.
106. Hellweg R, Nitsch R, Hock C, Jaksch M, Hoyer S. Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism. *J Neurosci Res* 1992;31:479-86.
107. Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44(2):491-4.
108. Grünblatt E, Hoyer S, Riederer P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2004;111:367-86.
109. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Weinstock M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol*. 2003;184(2):1043-52.
110. Duelli R, Schrock H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci* 1994;12(8):737-43.
111. Plaschke K, Hoyer S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci*. 1993;11:477-83.
112. Sultana R, Butterfield DA. Oxidative Modification of Brain Proteins in Alzheimer's Disease: Perspective on Future Studies Based on Results of Redox Proteomics Studies. *J Alzheimers Dis*. 2012 [Epub ahead of print].
113. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51:5308-32.
114. Isik AT, Celik T, Ulusoy G, Ongoru O, Elibol B, Doruk H, Bozoglu E, Kayir H, Mas MR, Akman S. Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model. *Age (Dordr)*. 2009;31:39-49.
115. Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, Nath C, Shukla R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol Res*. 2010;61:247-52.
116. Zhang X, Yin WK, Shi XD, Li Y. Curcumin activates Wnt/beta-catenin signaling pathway through inhibiting the activity of GSK-3beta in APPsw transfected SY5Y cells. *Eur J Pharm Sci*. 2011;42:540-6.
117. Kumar AP, Garcia GE, Ghosh R, Rajnarayanan RV, Alworth WL, Slaga TJ. 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid methyl ester: a curcumin derivative targets Akt/NF kappa B cell survival signaling pathway: potential for prostate cancer management. *Neoplasia*. 2003;5:255-66.
118. Stranahan AM, Lee K, Becker KG, Zhang Y, Maudsley S, Martin B, Cutler RG, Mattson MP. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice. *Neurobiol Aging*. 2010;31:1937-49.
119. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361:1545-64.
120. Ma T, Tzavaras N, Tsokas P, Landau EM, Blitzer RD. Synaptic stimulation of mTOR is mediated by Wnt signaling and regulation of glycogen synthetase kinase-3. *J Neurosci*. 2011;31:17537-46.
121. Javed H, Khan MM, Ahmad A, Vaibhav K, Ahmad ME, Khan A, Ashafaq M, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience*. 2012;210:340-52.
122. Sharma B, Singh N, Singh M. Modulation of celecoxib- and streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. *J Psychopharmacol*. 2008;22:162-71.
123. Tundo G, Ciaccio C, Sbardella D, Boraso M, Viviani B, Coletta M, Marini S. Somatostatin modulates insulin-degrading-enzyme metabolism: implications for the regulation of microglia activity in AD. *PLoS One*. 2012;7:e34376.
124. Marolda R, Ciotti MT, Matrone C, Possenti R, Calissano P, Cavallaro S, Severini C. Substance P activates ADAM9 mRNA expression and induces alpha-secretase-mediated amyloid precursor protein cleavage. *Neuropharmacology*. 2012;62:1954-63.
125. Liu Y, Studzinski C, Beckett T, Murphy MP, Klein RL, Hersh LB. Circulating neprilysin clears brain amyloid. *Mol Cell Neurosci*. 2010;45:101-7.
126. Rioli V, Gozzo FC, Heimann AS, Linardi A, Krieger JE, Shida CS, Almeida PC, Hyslop S, Eberlin MN, Ferro ES. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*. 2003;278:8547-55.
127. Arif M, Chikuma T, Ahmed MM, Nakazato M, Smith MA, Kato T. Effects of memantine on soluble Aβ(25-35)-induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's disease model rat brain regions. *Neuroscience*. 2009;164:1199-209.
128. Pollio G, Hoozemans JJ, Andersen CA, Roncarati R, Rosi MC, van Haastert ES, Seredenina T, Diamanti D, Gotta S, Fiorentini A, Magnoni L, Raggiaschi R, Rozemuller AJ, Casamenti F, Caricasole A, Terstappen GC. Increased expression of the oligopeptidase THOP1 is a neuroprotective response to Aβ toxicity. *Neurobiol Dis*. 2008;31:145-58.
129. Baggerman G, Verleyen P, Clynen E, Huybrechts J, De Loof A, Schoofs L. Peptidomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;803:3-16.
130. Fricker LD, Lim J, Pan H, Che FY. Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrom Rev*. 2006;25:327-44.
131. Stlemmon JR, Hughes CM, Campbell GA, Flood DG. Increased levels of hemoglobin-derived and other peptides in Alzheimer's disease cerebellum. *J Neurosci*. 1994;14:2225-35.
132. Poljak A, McLean CA, Sachdev P, Brodaty H, Smythe GA. Quantification of hemorphins in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Res*. 2004;75:704-14.
133. Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, Mertz R, Jaeger KH, Herz A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Eur J Pharmacol*. 1986;125:309-10.

134. Blishchenko EY, Sazonova OV, Kalinina OA, Yatskin ON, Philippova MM, Surovoy AY, Karelin AA, Ivanov VT. Family of hemorphins: co-relations between amino acid sequences and effects in cell cultures. *Peptides*. 2002;23:903-10.
135. Dale CS, Pagano Rde L, Rioli V. Hemopressin: a novel bioactive peptide derived from the alpha1-chain of hemoglobin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(Suppl 1):105-6.
136. Heimann AS, Gomes I, Dale CS, Pagano RL, Gupta A, de Souza LL, Luchessi AD, Castro LM, Giorgi R, Rioli V, Ferro ES, Devi LA. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:20588-93.
137. Fricker LD. Analysis of mouse brain peptides using mass spectrometry-based peptidomics: implications for novel functions ranging from non-classical neuropeptides to microproteins. *Mol Biosyst*. 2010;6:1355-65.
138. Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*. 2003;23:11136-41.
139. Fricker LD, Gelman JS, Castro LM, Gozzo FC, Ferro ES. Peptidomic analysis of HEK293T cells: effect of the proteasome inhibitor epoxomicin on intracellular peptides. *J Proteome Res*. 2012;11:1981-90.
140. Ferro ES, Hyslop S, Camargo AC. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. *J Neurochem*. 2004;91:769-77.
141. Russo, LC, Asega AF, Castro LM, Negraes PD, Cruz L, Gozzo FC, Ulrich H, Camargo AC, Rioli V, Ferro ES. Natural intracellular peptides can modulate the interactions of mouse brain proteins and thimet oligopeptidase with 14-3-3epsilon and calmodulin. *Proteomics*. 2012 [in press].