



Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Oligômeros do peptídeo A β inibem a
sinalização por insulina em neurônios
hipocampais: Implicações terapêuticas
para a doença de Alzheimer**

Theresa Rachel Jacinto de Souza Bomfim

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Química Biológica)

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Theresa Rachel Jacinto
de Souza Bomfim

Oligômeros do peptídeo A β inibem a sinalização por
insulina em neurônios hipocâmpais: Implicações
terapêuticas para a doença de Alzheimer

UFRJ

Theresa Rachel Jacinto de Souza Bomfim

Oligômeros do peptídeo A β inibem a sinalização por insulina em neurônios hipocâmpais: Implicações terapêuticas para a doença de Alzheimer

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Química Biológica)

Orientadora: Prof^a. Fernanda G. De Felice
Co-orientador: Prof. Sérgio Teixeira Ferreira

Rio de Janeiro
2010

Ficha Catalográfica

Rachel Jacinto de Souza Bomfim, Theresa.

Oligômeros do peptídeo A β inibem a sinalização por insulina em neurônios hipocâmpais: Implicações terapêuticas para a doença de Alzheimer – Theresa Rachel Jacinto de Souza Bomfim. Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM, 2010.

93 fl.: 10 Il.

Orientadora: Fernanda G. De Felice

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Instituto de Bioquímica Médica / Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2010.

Referências Bibliográficas: f. 71

I. Doença de Alzheimer. 2. Oligômeros do peptídeo beta-amilóide 3. Resistência a insulina. 4. Sinalização por insulina. 5. GLP-1. 6. Inflamação.

II. De Felice, Fernanda Guarino. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Título.

Theresa Rachel Jacinto de Souza Bomfim

Oligômeros do peptídeo A β inibem a sinalização por insulina em neurônios hipocâmpais:
Implicações terapêuticas para a doença de Alzheimer

Rio de Janeiro, 09 de abril de 2010

Fernanda Guarino De Felice

(Orientadora, Professora adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ)

Sérgio Teixeira Ferreira

(Co-orientador, Professor titular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ)

Flavia Carvalho Alcântara Gomes

(Professora adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ)

Roberto Lent

(Professor titular do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ)

Wagner Seixas da Silva

(Professor adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ)

Antônio Galina Filho

(Revisor, Professor adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ)

Jean Christophe Houzel

(Professor adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, à minha família.

Aos meus chefes Fernanda De Felice e Sérgio Ferreira.

Ao meu revisor Prof. Antônio Galina

Ao Prof. Michael Silverman.

À Prof^a. Martha Sorenson, por me iniciar na ciência.

À minha amiga Helena Decker.

Aos meus amigos Jordano Brito Moreira e Fábio Oliveira.

Ao meu amigo Marcelo Vieira.

À minhas queridas Máira, Mariângela e Claudinha.

Aos meus queridos amigos da família LDN, Rodrigo, Sofia, Gisele, Paulina, Milena, Léo 1 e Léo 2, Luciana, Letícia, Gabi, Nathália, Michael, Helen, Gabriel, Giovana, Igor. Vocês fazem dos meus dias mais felizes! Aprendo muito com cada um de vocês todos os dias!

Aos membros da banca, Prof^a. Flávia Gomes, Prof. Roberto Lent e Prof. Wagner Seixas.

Aos meus amigos do IBqM.

Dedico essa dissertação a
minha avó, Águeda Jubim
Jacinto, mulher sábia,
exemplo de amor e
dedicação.

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Professora Fernanda Guarino De Felice e co-orientação do Professor Sérgio T. Ferreira, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

RESUMO

BOMFIM, Theresa Rachel Jacinto de Souza. Oligômeros do peptídeo A β inibem a sinalização por insulina em neurônios hipocâmpais: Implicações terapêuticas para a doença de Alzheimer. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

A sinalização de insulina no cérebro, fundamental para a formação de memória, está prejudicada na doença de Alzheimer (DA). Acredita-se que isto possa desencadear um novo tipo de diabetes resistente a insulina no cérebro de pacientes com DA. Foi recentemente demonstrado que a estimulação da sinalização de insulina previne a deterioração das sinapses causadas pelos oligômeros do peptídeo β -amilóide (A β). Oligômeros (também conhecidos como ADDLs) são neurotoxinas que acumulam no cérebro de pacientes DA e perturbam processos relacionados à plasticidade sináptica e memória. Com o objetivo de determinar porque os neurônios se tornam resistentes a insulina na DA, investigamos o impacto dos oligômeros sobre a sinalização de insulina. Usando neurônios hipocâmpais maduros em cultura, observamos que os oligômeros inibem a fosforilação fisiológica dos resíduos de tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS-1) pelo receptor de insulina (RI) e induzem a fosforilação em serina do IRS-1, similar ao que ocorre no diabetes tipo 2. Sugerindo que mecanismos similares operam na resistência a insulina periférica e cerebral, a fosforilação anormal do IRS-1 induzida pelos oligômeros foi bloqueada pelo inibidor da c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) SP600125 e pelo infliximab, um anticorpo monoclonal que se liga ao fator de necrose tumoral (TNF- α) usado para tratar artrite. Significativamente, o análogo do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), exendina-4 e a insulina, drogas que são usadas para o tratamento de diabetes, totalmente bloquearam o impacto deletério dos oligômeros sobre a sinalização do RI. Adicionalmente, demonstramos que oligômeros de A β bloqueiam o transporte axonal de mitocôndrias e de vesículas secretoras densas e que este defeito no transporte foi prevenido pelo exendina-4, insulina e SP600125. Nossos achados estabelecem um mecanismo celular pelo qual os oligômeros de A β induzem a resistência a insulina neuronal e sugere que exendina-4 e infliximab podem ser novos compostos capazes de proteger os neurônios contra o dano induzido pelos oligômeros na DA.

ABSTRACT

BOMFIM, Theresa Rachel Jacinto de Souza. Oligômeros do peptídeo A β inibem a sinalização por insulina em neurônios hipocampais: Implicações terapêuticas para a doença de Alzheimer. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Brain insulin signaling, fundamental for memory formation, is impaired in Alzheimer's disease (AD). This is thought to trigger a novel type of insulin-resistant diabetes in the brains of AD patients. Bolstering insulin signaling was recently shown to prevent synapse deterioration caused by amyloid- β peptide (A β) oligomers. Oligomers (also known as ADDLs) are neurotoxins that accumulate in the brains of AD patients and disrupt processes linked to synaptic plasticity and memory. To determine why neurons become resistant to insulin in AD, we have investigated the impact of oligomers on insulin signaling. Using mature hippocampal neurons in culture, we found that oligomers inhibit physiological tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) by the insulin receptor (IR) and induce IRS-1 serine phosphorylation, similar to what occurs in type 2 diabetes. Suggesting that similar mechanisms operate in peripheral and brain insulin resistance, oligomer-induced abnormal IRS-1 phosphorylation was blocked by the c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) inhibitor SP600125 and by infliximab, a tumor necrosis factor- α (TNF- α) blocking monoclonal antibody currently used to treat arthritis. Most significantly, the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog exendin-4 and insulin, drugs used for treatment of diabetes, fully blocked the deleterious impact of oligomers on IR signaling. We further show that A β oligomers block axonal transport of mitochondria and dense core vesicles and that this transport defect was prevented by exendin-4, insulin and SP600125. Our findings establish a cellular mechanism by which A β oligomers instigate neuronal insulin resistance and suggest that exendin-4 and infliximab may be attractive new agents to defend neurons against oligomer-induced damage in AD.

Sumário

I) Introdução	13
I.1) Doença de Alzheimer.....	13
I.2) Peptídeo β -amilóide ($A\beta$).....	17
I.3) Sinalização de Insulina nos tecidos periféricos e no cérebro.....	22
I.3.1) Sinalização nos tecidos periféricos	22
I.3.2) Modulação da sinalização de insulina	28
I.3.3) Resistência à insulina.....	29
I.3.4) Sinalização de insulina no Sistema Nervoso Central.....	31
I.3.4.1) Insulina e Plasticidade Sináptica.....	33
I.4) Relação entre Doença de Alzheimer e resistência à insulina.....	35
I.5) Papel da Exendina-4 na ativação de receptores do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1).....	37
I.5.1) Efeitos do GLP-1 no Sistema Nervoso Central	39
I.6) Transporte axonal	40
I.6.1) Transporte axonal, envelhecimento e Doença de Alzheimer.....	43
I.7) Doença de Alzheimer e Inflamação	45
I.7.1) Mediadores celulares de inflamação no SNC	46
I.7.2) Mediadores moleculares inflamatórios.....	48
I.7.2.1) Fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$).....	49
I.7.2.2) Fator de necrose tumoral e doença de Alzheimer	51
II) Objetivos.....	54
III) Métodos.....	55
III.1) Preparação e caracterização dos oligômeros de $A\beta$	55
III.1.1) Gel-filtração por HPLC.....	56
III.1.2) <i>Western blot</i> para Oligômeros de $A\beta$	57
III.2) Culturas primárias de hipocampo rato	59
III.3) Imunocitoquímica	59
III.4) Análises dos Resultados.....	60
IV) Resultados	62
IV.1) Artigo	62
V) Discussão.....	63
VI) Referências.....	71
VII) Anexos	93

I) INTRODUÇÃO

I.1) Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é o tipo de demência mais comum que atinge o homem durante o envelhecimento. Os indivíduos acometidos por esse processo neurodegenerativo são progressivamente privados de importantes propriedades: memória, raciocínio, julgamento e linguagem (Walsh and Selkoe, 2004; Alzheimer e cols., 1995). Atualmente, um número estimado de 5.3 milhões de americanos tem a doença de Alzheimer (Hebert e cols., 2003). Uma em cada oito pessoas com 65 anos ou mais é acometida pela DA, com uma incidência de 13% (Plassman e cols., 2007). Entretanto, esse número aumenta para 33% para indivíduos com 85 anos ou mais (Seshadri e cols., 2006). Um relatório publicado recentemente pela Associação Americana de Alzheimer (*Alzheimer' Association*) mostrou que aproximadamente 35,6 milhões de pessoas vivem no mundo com Alzheimer em 2010 (*World Alzheimer Report*, 2009). Com o aumento da expectativa de vida, estima-se que este número deverá dobrar em até 20 anos, para 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050. (Ferri e cols., 2005; Brookmeyer e cols., 2007; Kalaria e cols., 2008).

Morfologicamente, o cérebro DA, no estágio final, é caracterizado pela redução da formação hipocampal e do córtex cerebral, além do alargamento dos ventrículos laterais e estreitamento dos giros (Fig 1 A e B). A análise histopatológica destes cérebros apresenta lesões características da doença que são os emaranhados neurofibrilares e as placas senis ou placas amilóides. Esses marcadores histopatológicos (Fig 1 C e D) foram inicialmente descritos pelo psiquiatra Alois Alzheimer ao examinar o cérebro de sua paciente August D.

em 1906 (para uma tradução em inglês do artigo original de Alois Alzheimer, ver Alzheimer e cols., 1995). É importante ressaltar que, até os dias de hoje, após 104 anos da descrição do primeiro caso de DA, o diagnóstico definitivo desta doença é feito *post-mortem*, sendo possível somente após a detecção das lesões descritas acima no cérebro dos pacientes. Na prática clínica, um provável diagnóstico de DA é realizado através de exclusão de outras possíveis causas de demências e da aplicação testes neuropsicológicos específicos (Braak and Braak, 1998).

Os emaranhados neurofibrilares são agregados intracelulares constituídos de proteína tau hiperfosforilada. Nesta condição, a tau perde sua função fisiológica de associar-se aos microtúbulos e estabilizá-los, formando assim, filamentos helicoidais pareados que agregam no interior das células neuronais. Por outro lado, as placas senis ou placas amilóides são depósitos extracelulares majoritariamente constituídas por agregados do peptídeo β -amilóide ($A\beta$), gerados a partir da clivagem da proteína precursora amilóide (APP) através da ação das enzimas conhecidas como β - e γ - secretases (Selkoe e cols., 1996; Gralle and Ferreira, 2007) (Fig 2).

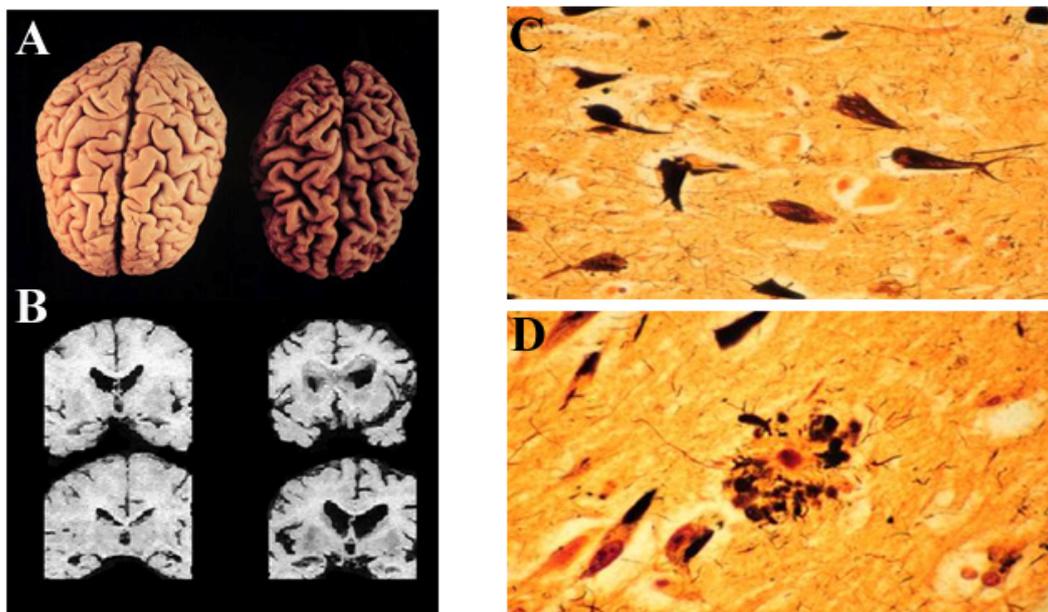


Figura 1: Marcadores histopatológicos da doença de Alzheimer. A) Cérebro acometido pela doença (à direita), exibindo considerável alargamento dos sulcos e estreitamento dos giros, além de notável atrofia cerebral em comparação a um cérebro de um indivíduo não demenciado (à esquerda). B) Cortes coronais de um cérebro de um paciente com Alzheimer (à direita) revelam o aumento do volume ventricular e a perda de massa cerebral quando comparado com um cérebro de um indivíduo não demenciado (à esquerda). C) Emaranhados neurofibrilares (intracelulares) corados por prata. D) Placas senil (extracelulares) corada por prata.

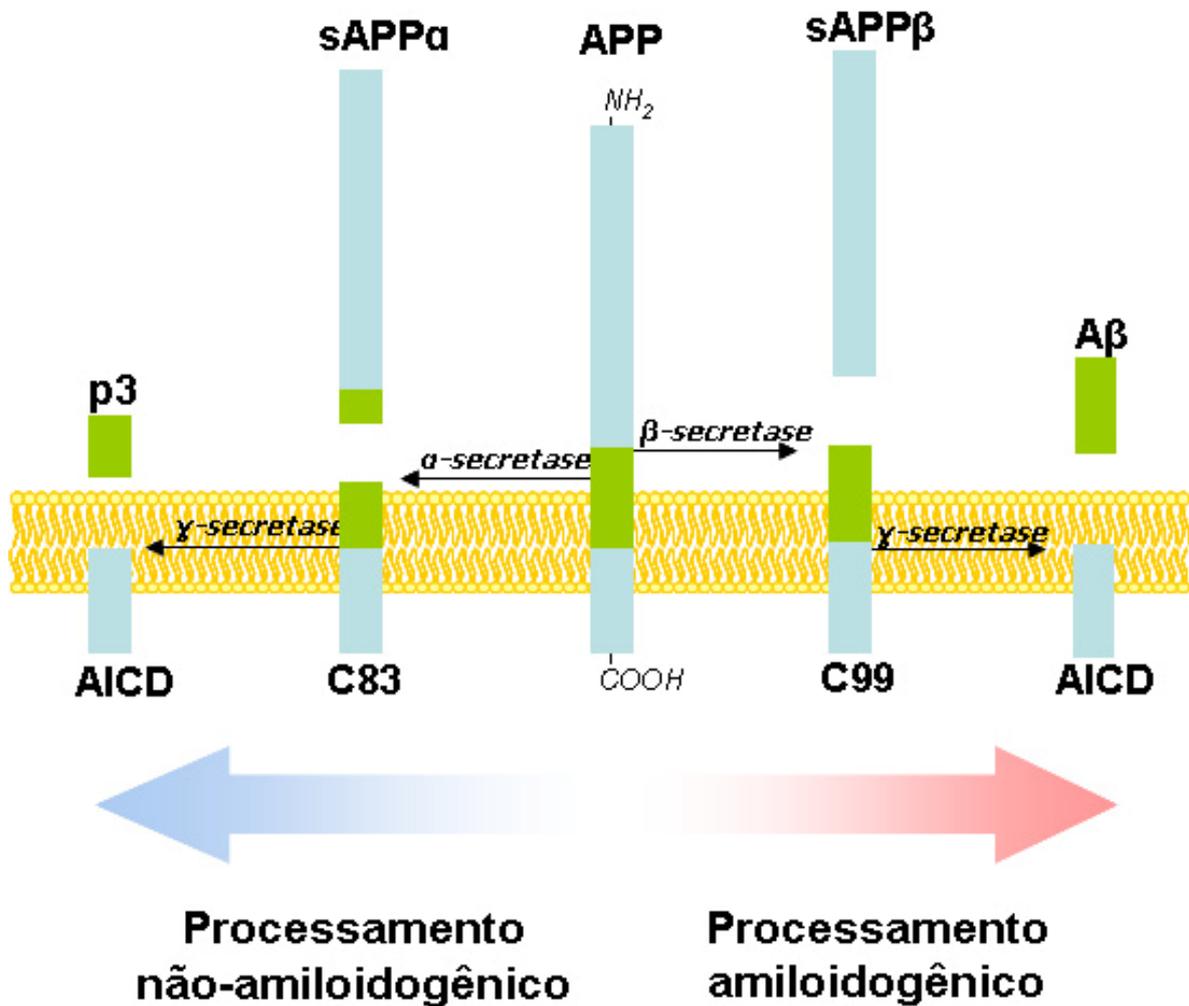


Figura 2: Processamento da proteína precursora amilóide (APP). Processamento amiloidogênico e não amiloidogênico da APP na membrana plasmática. Na via não amiloidogênica, a clivagem da APP pela α -secretase libera um ectodomínio solúvel (SAPP α) para o meio extracelular e gera um fragmento residual de 83 aminoácidos C-terminal (C-83) na membrana. O C-83 é clivado pela γ -secretase liberando o peptídeo p3. Na via amiloidogênica a APP é clivada pela β -secretase, o que resulta na secreção da molécula levemente truncada sAPP β e na retenção de um fragmento de 99 resíduos C-terminal (C-99). O C-99 é clivado pela γ -secretase gerando o peptídeo A β (destacado em verde). A clivagem de ambos os fragmentos, C83 e C99, libera o fragmento intracelular AICD. Figura produzida e gentilmente cedida por Marcelo Nunes Vieira.

I.2) Peptídeo β -amilóide (A β)

A partir da identificação do A β como componente majoritário das placas senis (Glennner and Wong, 1984; Masters e cols., 1985), diversos estudos tiveram início com o propósito de melhor entender a participação deste peptídeo na fisiopatologia da DA. Crescente é o número de evidências que suportam um papel central para o A β na disfunção neuronal e neurodegeneração que acomete o indivíduo doente (Geula e cols., 1998; Wang e cols., 2004; Klein, 2006; Ferreira e cols., 2007). Essas evidências são resultados de estudos genéticos de casos de formas familiares (hereditárias) da doença que ocorrem precocemente, representando uma minoria, com uma incidência aproximada de 5% (Selkoe, 2004; Bertram and Tanzi, 2005) Nesses casos, onde pacientes são precocemente afetados pela doença, em torno da quarta ou quinta década de vida, mutações na APP ou nas enzimas que clivam a APP levam à formação exacerbada de A β . Entretanto, a maioria dos casos de DA é esporádica, não tendo sido ainda identificado nenhum fator genético determinante desta condição (Selkoe, 2004; Roberson and Mucke, 2006). Nesses casos, a doença está associada ao envelhecimento.

É importante ressaltar que o acúmulo de A β é o ponto comum a todos os casos de DA, esporádicos e hereditários. A hipótese mais aceita pelos estudiosos da área para explicar a etiologia da doença, foi descrita em sua versão original por (Hardy and Higgins, 1992), e propõe que o A β acumulado no cérebro doente inicie uma cascata de sinalização celular que leva à disfunção celular e posteriormente a morte, resultando em um estado de demência. Com as contribuições dos estudos que sucederam essa proposta inicial da cascata

amilóide, uma nova versão foi elaborada por Hardy e Selkoe (Hardy and Selkoe, 2002). Essa hipótese revisada apresenta algumas modificações importantes, como incluir o impacto neurotóxico do peptídeo beta amilóide, especialmente na sua forma oligomérica (Fig. 3).

Desde a década de 90, muitos estudos têm focado seus esforços sobre a forma oligomérica do A β , em vista das crescentes evidências de que estas formas são neurotóxicas e estão presentes no cérebro de pacientes com DA (Gong e cols., 2003; Ferreira e cols., 2007). De fato, estudos identificaram os oligômeros de A β em concentrações até 70 vezes mais altas em extratos de cérebros com DA comparados com indivíduos controles não demenciados, e revelaram ainda, que as características físico-químicas destes oligômeros endógenos são muito similares a dos sintetizados *in vitro* (Gong e cols., 2003, De Felice e cols., 2008). Esses dados reforçam e validam a relevância clínica do uso dos oligômeros do peptídeo β -amilóide como modelo experimental e ainda como alvo terapêutico para a Doença de Alzheimer.

Um achado pioneiro demonstrou que oligômeros de A β (também conhecidos como ADDLs, do inglês *A β -Derived Diffusible Ligands*), em concentrações na ordem de nanomolar, prejudicam potencialmente mecanismos de plasticidade sináptica por inibir a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) no hipocampo, evento fisiológico crucial para a aquisição e formação de memória. Adicionalmente, os oligômeros inibem a reversão da depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*) (Lambert e cols., 1998; Walsh e cols., 2002), que é um processo inicial de depressão sináptica que culmina com a eliminação da espinha (Hsieh e cols., 2006).

Uma dramática redução do número de espinhas dendríticas é observada após um longo período de incubação com os oligômeros (Hsieh e cols., 2006; Lacor e cols., 2007;

De Felice e cols., 2009). Como as espinhas são protruções especializadas dos dendritos nas quais ocorrem as sinapses excitatórias, o impacto dos oligômeros nas sinapses sugere a base para a perda da conectividade neuronal e conseqüentemente para o déficit cognitivo observado nos pacientes com a DA. Estes efeitos deletérios sobre as sinapses são provavelmente resultado da capacidade dos oligômeros de se ligarem com grande especificidade a sítios sinápticos excitatórios (Lacor e cols., 2004), evento este, de particular relevância para o mecanismo da perda de memória.

Recentes estudos têm investigado os mecanismos utilizados pelos oligômeros para danificar a plasticidade sináptica. Um destes, a transmissão glutamatérgica, é considerada a base para os estímulos excitatórios associados com aprendizado e memória (Bennett, 2000). Os receptores de glutamato do tipo AMPA e NMDA realizam um papel central na transmissão glutamatérgica e são requeridos para indução de LTP e fortalecimento sináptico (Derkach e cols., 2007; Lau and Zukin, 2007). Trabalhos adicionais demonstraram uma maciça redução dos níveis de receptores AMPA e NMDA da membrana neuronal plasmática (Lacor e cols., 2007; Snyder e cols., 2005; Almeida e cols., 2005; Roselli e cols., 2005; Hsieh e cols., 2006; Goto e cols., 2006).

De forma significativa, a densidade pós-sináptica 95 (PSD-95, do inglês *post-density-95*), uma proteína que forma um arcabouço fundamental para o ancoramento e estabilização dos receptores AMPA e NMDA, também é reduzida após tratamento com os oligômeros de A β (Roselli e cols., 2005). Dentre os receptores acima citados, podemos ainda destacar que os receptores de insulina, que também desempenham um papel crucial para a plasticidade neuronal, encontram-se dramaticamente reduzidos da membrana plasmática após exposição neuronal aos oligômeros (De Felice e cols., 2009; Zhao e cols., 2008).

É importante ressaltar que, a perda patológica de espinhas e suas moléculas associadas é bem descrita para os casos de doença de Alzheimer (Scheibel e cols., 1975; Shim and Lubec, 2002; Scheff and Price, 2003) e modelos de camundongos transgênicos para DA (Lanz e cols., 2003; Calon e cols., 2004; Moolman e cols., 2004; Spires e cols., 2005; Jacobsen e cols., 2006) . Adicionalmente, outros trabalhos demonstraram que tanto pacientes com DA (Gong e cols., 2003; Lacor e cols., 2004) quanto modelos de animais transgênicos para DA (Chang e cols., 2003; Oddo e cols., 2006; Ohno e cols., 2006) acumulam níveis substanciais de oligômeros de A β .

Eventos adicionais causados pelos oligômeros, que também interferem com processos sinápticos importantes, incluem a fosforilação aberrante de tau em resíduos que caracteristicamente estão hiperfosforilados em cérebros de pacientes com DA (De Felice e cols., 2008), além de estresse oxidativo e um influxo neuronal excessivo de cálcio, possivelmente causado pela disregulação das funções dos receptores NMDA (De Felice e cols., 2007). A reunião destes achados sugere que as sinapses são o principal alvo dos oligômeros, e que esta interação leva a mudanças morfológicas e na composição de receptores resultando na disfunção sináptica, provavelmente responsável pelo declínio cognitivo inicial que acomete indivíduos com DA (Klein, 2006).

Hipótese da cascata amilóide

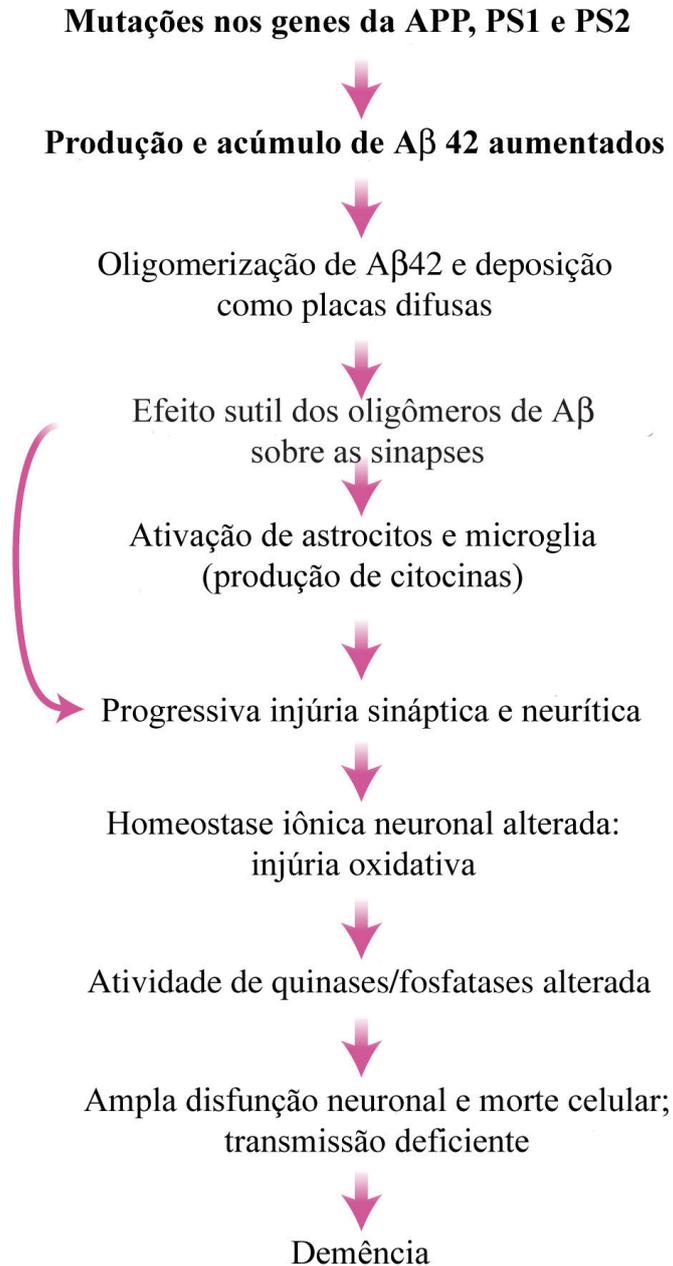


Figura 3: Hipótese da cascata amilóide revisada. Seqüência de eventos que levam a doença de Alzheimer. As setas curvas indicam que os oligômeros de A β podem diretamente afetar as sinapses. Adaptado de Hardy and Selkoe, 2002.

I.3) Sinalização de Insulina nos tecidos periféricos e no cérebro

I.3.1. Sinalização nos tecidos periféricos

Um dilema interessante que precisa ser enfrentado por todos os animais é o ciclo de alimentação, seguido pelo jejum que se dá entre as refeições. Os mamíferos resolvem bem este problema através da estocagem de nutrientes, de forma que esse estoque possa ser utilizado como fonte de energia durante os períodos longos de jejum. Um importante agente que regula este processo é a insulina, um hormônio liberado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta a elevados níveis de nutrientes no suprimento sanguíneo, como a glicose. Ao se ligar ao seu receptor em tecidos responsivos, a insulina dispara a ativação de vias de sinalização, cuja principal função nos tecidos periféricos, é estimular o transporte de nutrientes, como glicose, ácidos graxos e aminoácidos, do sangue para os tecidos. Nestes, a insulina promove a conversão dos nutrientes em macromoléculas, tais como glicogênio, triglicerídeos e proteínas, que serão estocadas como fontes de energia.

Além disso, a sinalização de insulina tem um amplo espectro na fisiologia dos mamíferos, pois durante o desenvolvimento, a insulina também promove o crescimento somático (Baker e cols., 1993; Liu e cols., 1993), e, após o nascimento, promove crescimento e sobrevivência celular de muitos tecidos, incluindo células β pancreáticas, neuronais, ósseas, da retina, por exemplo (Dudek e cols., 1997; Hellstrom e cols., 2001; Pete e cols., 1999).

Desta forma, a ação da insulina nos órgãos periféricos é considerada um dos principais hormônios anabólicos, sendo fundamental para o desenvolvimento, crescimento, homeostase de glicose, metabolismo de ácidos graxos e proteínas e importante para uma função apropriada das células β do pâncreas (Le and Zick, 2001).

A nível molecular, a insulina liga-se ao seu receptor, que pertence a uma subfamília de receptores tirosina quinases. Esses receptores incluem, dentre outros, o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF, do inglês *insulin-like growth factor*) e o receptor relacionado ao receptor de insulina (IRR, do inglês *insulin receptor-related receptor*) (Patti and Kahn, 1998). O receptor de insulina (RI) é uma proteína heterotetramérica constituído por dímeros intrínsecos ligados por pontes dissulfeto, estes, são compostos por domínios extracelulares (subunidades α) que controlam a atividade tirosina quinase dos domínios transmembrana (subunidades β) (Patti and Kahn, 1998; Ebina e cols., 1985; Ullrich e cols., 1985). Após a ligação da insulina na subunidade α , ocorre um aumento da atividade tirosina quinase das subunidades β , que induz uma reação de autofosforilação dos resíduos de tirosina desta subunidade do receptor de insulina. Sabe-se que a fosforilação de tirosina realiza um papel importante em diversos processos fisiológicos por controlar diretamente a atividade de receptores e/ou enzimas presentes em passos iniciais de algumas cascatas de sinalização, e ainda por coordenar o ancoramento de multicomponentes de um complexo de sinalização próximo aos receptores ativados (Pawson, 1995). Assim, grande parte dos sinais intracelulares da sinalização de insulina é gerada através de complexos de sinalização formados por proteínas que se ancoram próximo aos resíduos de fosfotirosina.

No mínimo, nove substratos intracelulares do RI tem sido identificados, sendo que quatro destes pertencem à família dos substratos do receptor de insulina (IRS, do inglês *insulin receptor substrate protein*) (White and Yenush, 1998), além de outras proteínas adaptadoras como ShC, APS, SH2B, GAB1/2 e DOCK1/2 (Baumann e cols., 2000; Pawson and Scott, 1997; White and Yenush, 1998). Embora o papel de cada uma destas proteínas mereça atenção, recentes trabalhos sugerem que a maioria das respostas a insulina,

especialmente aquelas associadas com o crescimento e metabolismo de carboidratos, são amplamente mediadas através de duas isoformas do substrato do receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2 (White, 2003).

As proteínas IRS não apresentam uma atividade catalítica intrínseca, sendo compostas por múltiplos domínios de interação e sítios de fosforilação. No mínimo, três isoformas de IRS estão presentes em humanos e camundongos, sendo estas IRS-1 e IRS-2 que são amplamente expressos, e ainda IRS-4, o qual tem sua expressão limitada ao timo, cérebro, rim e possivelmente a células β pancreáticas. Roedores também expressam IRS-3, o qual é bastante restrito ao tecido adiposo e demonstra atividades similares ao IRS-1 (Uchida e cols., 2000). Todas as proteínas IRS apresentam domínios protéicos em sua estrutura denominados a partir de sua homologia com proteínas já descritas. Dentre os domínios que permitem o reconhecimento dos IRSs pelo RI e por outras proteínas da via, podemos citar os domínios PH (do inglês *pleckstrin homology*), o PTB (*phospho-tyrosine binding*) e o SH (*Src homology*, podendo ser denominados SH2 e SH3), que são os mais bem descritos e de maior importância (Yenush e cols., 1998).

A propagação do sinal da insulina, a partir da ativação dos IRS, ocorre através de outra classe de proteínas, que são os adaptadores SH2. Estes se ligam aos resíduos de fosfotirosina dos IRS através de seus domínios SH2, possibilitando assim, a ligação de outras proteínas da via. Como exemplos de adaptadores SH2, podemos citar a subunidade regulatória da fosfoinositol 3 quinase (PI3K, do inglês *phosphoinositide 3-kinase*), assim como a Grb2 (do inglês, *growth factor receptor-bound protein*). Esta última, pode ligar-se ao RI ativo, estimulando a interação entre outras duas proteínas que são a SOS e a Ras, resultando na indução da atividade GTPase da Ras disparando a sinalização para a divisão celular através da MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*) (Avruch, 1998;

Denton and Tavaré, 1995). Além das proteínas que citamos aqui, diversas outras já foram descritas como participantes imediatos da transmissão do sinal iniciado pela ligação da insulina ao seu receptor.

Esses adaptadores protéicos fazem a conexão entre os receptores de insulina e os componentes seguintes desta via, sendo que um dos principais envolvidos e melhores descritos desta cascata de sinalização é a PI3-K, que desempenha um papel central nas ações metabólicas e mitogênicas da insulina (Shepherd e cols., 1995). A PI3-K é constituída por uma subunidade catalítica p110, e uma subunidade regulatória p85 que apresenta dois domínios SH2 para interagir com os resíduos de fosfotirosina dos IRSs (Myers, Jr. e cols., 1992). No mínimo, oito subunidades regulatórias têm sido identificadas, derivadas da expressão de três genes (p85 α , p85 β e p55^{PIK}) (Pons e cols., 1995), destas, a p85 α é a predominante.

A ativação da PI3-K pode transmitir múltiplos sinais catalisados através da reação de fosforilação de fosfoinosítois da membrana plasmática. Esta reação promove a conversão de fosfoinosítois bifosfato PI(4,5)P₂ em fosfoinosítois trifosfato PI(3,4,5)P₃, principal produto desta enzima (Newgard and McGarry, 1995; Prentki e cols., 1997). Os PIP₃ podem modular a função de proteínas-alvo por ligar-se aos seus domínios PH, alterando sua atividade e localização subcelular, direcionando-as para a membrana plasmática (Lietzke e cols., 2000)

Desta forma, os PIP₃ regulam três classes de moléculas de sinalização: as proteínas serina/threonina quinase (Peterson and Schreiber, 1999), as proteínas da família Rho de GTPases (Mackay and Hall, 1998) e as proteínas tirosina quinase da família TEC. Dentre as serina/threonina quinases, a melhor caracterizada é a proteína quinase dependente de fosfoinosítois 1 (PDK-1, *phosphoinositide-dependent kinase 1*) que ativa em seguida a Akt

ou proteína quinase B (PKB, *protein kinase B*)(Alessi e cols., 1997). Esta proteína também apresenta o domínio PH e pode interagir diretamente com os PIP₃. A Akt também se faz importante na transmissão da sinalização por insulina, por ativar a proteína glicogênio sintase cinase-3(GSK-3), assim como os fatores de transcrição forkhead e o elemento responsivo ao AMPc (*cAMP response element-binding protein*, CREB) (Nakae e cols., 1999). Podemos ainda citar outros efetores subseqüentes da PKB, como a mTOR (*mammalian target of rapamycin*), p70 S6 cinase, assim como isoformas atípicas da PKC (*protein kinase C*) todas estas levando ao aumento do transporte de glicose, síntese de proteína e de glicogênio (Cantley, 2002).

Outras vias que estão envolvidas, e através das quais a sinalização da insulina é propagada, são as vias da MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*) e a via da Cbl/CAP (Cbl-associated protein). A ativação da cascata da MAPK induz crescimento celular e atividade mitótica. Por outro lado, a Cbl é fosforilada em resíduos de tirosina pela atividade da quinase do receptor de insulina (IRK, *insulin receptor kinase*), mediando a ativação do transporte de glicose através da ativação de TC10 e sua interação com um complexo de exocitose (Inoue e cols., 2003; Chiang e cols., 2001).

Assim, ação da insulina abrange diversas vias de sinalização, que coletivamente propagam sinais de suma importância para a homeostase corporal, (Lizcano and Alessi, 2002; Saltiel and Kahn, 2001; White, 2003; Pirola e cols., 2004) (Fig 4).

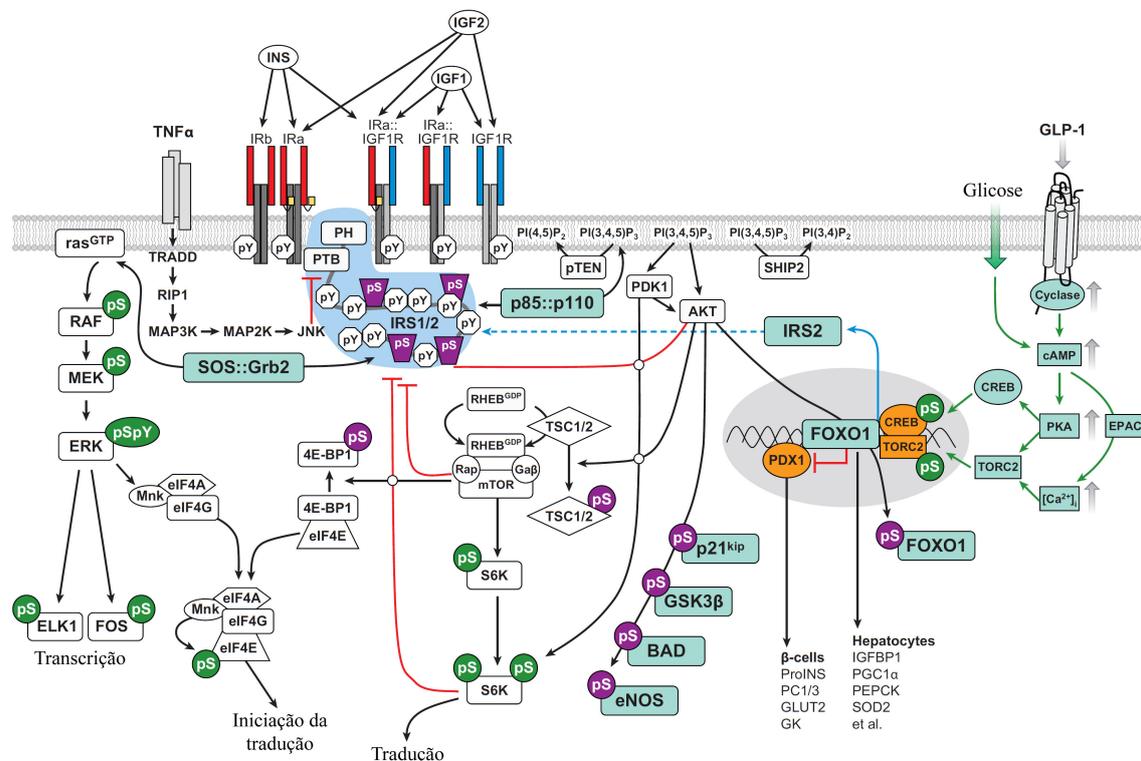


Figura 4: A cascata de sinalização de insulina e dos fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF 1 e 2): Estes peptídeos se ligam as cinco diferentes isoformas de receptor disparando um sinal citoplasmático: duas isoformas de receptor de insulina, IRa e IRb (vermelho); os receptores do fator de crescimento semelhante a insulina 1, IGF1R (azul); e as formas híbridas do receptor, IRa::IGF1R e IRb::IGF1R. A ativação dos receptores induz a fosforilação de proteínas celulares IRS1 e IRS2, porém outros substratos podem ser ativados, transmitindo o sinal da insulina por diversas vias. As fosforilações em lilás representam fosforilações inibitórias, as que estão em verde, representam as estimulatórias. Em células β , GLP-1 e glicose estimula o aumento de cálcio e da sinalização mediada por AMPc, induzindo o aumento da expressão de IRS2 através de CREB e TORC2. Adaptado de Taguchi and White, 2008.

I.3.2) Modulação da sinalização de insulina.

A duração e o alcance da sinalização de insulina são regulados em diferentes níveis, sendo que alguns mecanismos de controle são imediatamente ativados após estímulo da insulina. Estes mecanismos agem finalizando o sinal da insulina através da ativação de fosfatases lipídicas ou protéicas, ou ainda através de serina/treonina quinases que desacoplam diversos elementos ao longo da via de sinalização da insulina. Do mesmo modo, outro mecanismo de controle de feedback negativo opera com uma escala de tempo maior, envolvendo a redução do conteúdo celular de receptor de insulina e seus substratos.

O controle sobre a sinalização de insulina pode ser alcançado por autoregulação, onde enzimas downstream de uma via inibem componentes upstream, sendo este um mecanismo de dessensibilização homóloga. Por outro lado, sinais de outras vias, aparentemente não relacionadas, podem inibir a sinalização de insulina como uma dessensibilização heteróloga. Como alvos desta regulação, podemos destacar o RI, os IRS e as proteínas Shc. Trabalhos recentes vêm demonstrando que a fosforilação de resíduos de serina/treonina do IRS é o principal mecanismo que controla o acoplamento desta proteína aos seus efetores, regulando assim a transmissão do sinal iniciado pela insulina em seu receptor (Zick, 2001; Paz e cols., 1997; Liu e cols., 2001).

Interessantemente, a fosforilação nos resíduos serina/treonina, tem uma função dupla, agindo tanto como um modulador positivo quanto negativo da resposta a insulina. A fosforilação de resíduos de serina presentes dentro do domínio PTB do IRS pela PKB, estimulada pela insulina, fornece uma proteção contra a rápida ação das proteínas tirosina

fosfatases (do inglês *phosphatases Tyrosine protein*) conservando conformação ativa do IRS. Isto sugere que a PKB age como um regulador positivo das funções deste substrato (Paz e cols., 1999). Por outro lado, a fosforilação em resíduos serina/treonina do IRS por outras quinases estimuladas pela insulina, como a PKC ζ (Liu e cols., 2001) agem como um mecanismo de controle negativo, por inibir adicionais fosforilações em resíduos de tirosina no IRS, bloqueando as funções deste substrato (Mothe and Van, 1996; Neid e cols., 2004; Ravichandran e cols., 2001).

Além disso, a fosforilação dos resíduos de serina/treonina pode induzir também a dissociação do IRS do receptor de insulina (Paz e cols., 1997; Liu e cols., 2001), desfazendo o complexo protéico que mantém o IRS intimamente próximo ao RI (Tirosh e cols., 1999), induzindo a degradação do IRS (Pederson e cols., 2001) e ainda convertendo o IRS em inibidor da quinase do receptor de insulina (IRK, *insulin receptor kinase*) (Hotamisligil e cols., 1996).

Diversas são as enzimas que exercem estes múltiplos efeitos, dentre estas podemos destacar as serina/treonina quinases que fosforilam o IRS. Uma delas é a mTOR, que aumenta a fosforilação em resíduos de serina no C-terminal do IRS, inibindo tanto sua fosforilação em resíduos de tirosina, após estímulo pela insulina, quanto sua habilidade de se associar a PI3-K (Li e cols., 1999). Outra quinase envolvida é a IKK β (*I-kappa B kinase β*), que constitui um complexo IKK que fosforila o inibidor do fator nuclear κ B (NF- κ B), o I κ B. Dados recentes demonstram que o IRS é um substrato direto da IKK β , que o fosforila na serina 312 mediante estresse celular (Gao e cols., 2002). É importante notar que a participação da quinase c-Jun N-terminal (JNK), em associação com o IRS, leva à sua fosforilação em resíduos de serina (Lee e cols., 2003).

I.3.3) Resistência à insulina

Interessantemente, as quinases acima citadas, descritas como reguladores negativos da transmissão do sinal iniciado pela insulina, também estão envolvidas em processos de sinalização que levam a um quadro de resistência à insulina. Esse é um estado patológico, no qual células alvo falham em responder aos níveis de insulina circulantes. Indivíduos com resistência a insulina estão predispostos a desenvolver Diabetes do tipo II, que pode ser associada com outros distúrbios de saúde, incluindo obesidade, hipertensão, infecção crônica e ainda doenças cardiovasculares, o que torna este quadro de resistência a insulina alvo preocupação e atenção de um grande número de estudos em saúde pública (Kahn and Flier, 2000).

Com base em estudos recentes, alguns fatores vêm sendo implicados neste processo de resistência, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF α), uma citocina pró-inflamatória, ácidos graxos livres (FFA, do inglês *free fatty acids*) além de outras moléculas sinalizadoras de estresse celular. Esses fatores são bem descritos como capazes de inibir o sinal da insulina por ativar quinases de resíduos de serina/treonina que fosforilam o IRS, bloqueando sua função. O TNF α pode ativar diferentes quinases como a PKC ζ , a IKK β e a JNK que tem sua atividade extremamente elevada em indivíduos obesos (Guilherme e cols., 2008). Outras isoformas de PKC, como a PKC θ , também são ativadas, porém foram implicadas como mediadores de FFA na indução de resistência a insulina em músculo esquelético (Yu e cols., 2002). Além das enzimas citadas, a GSK3 (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997) e a caseína quinase II (Tanasijevic e cols., 1993) são consideradas novas potentes quinases inibitórias do IRS, estimuladas por indutores de resistência a insulina.

A reunião destas informações sugere que a fosforilação do IRS em resíduos de serina representa um importante mecanismo que leva a resistência à insulina. Adicionalmente, a ativação das serina/treonina quinases participa da regulação do IRS em condições fisiológicas ou patológicas. Assim, apesar de ser um sistema dinâmico e complexo, a regulação das proteínas IRS é um excitante campo de estudos para a busca de agentes terapêuticos para o tratamento da resistência a insulina, assim como do diabetes tipo II.

I.3.4) Sinalização de insulina no Sistema Nervoso Central

Há pouco mais de duas décadas, surgiu um novo campo de pesquisa na Neurociência que foi a investigação da sinalização de insulina no cérebro. Por muito tempo acreditou-se que o SNC não fosse sensível aos níveis de insulina periférica. Entretanto, em seguida foi observada a presença de receptores de insulina (RI) no SNC (Havrankova e cols., 1983; Havrankova e cols., 1978; Plum e cols., 2005), em células neuronais e gliais, abundantemente distribuídos no córtex cerebral e hipocampo (van der Heide e cols., 2006). Estudos adicionais demonstraram que o receptor de insulina está localizado nas sinapses de neurônios hipocámpais (Abbott e cols., 1999). A presença da insulina no cérebro também foi detectada (Baskin e cols., 1983b; Baskin e cols., 1983a; Baskin e cols., 1987). Atualmente é sabido, que o RI é amplamente expresso por todo o cérebro, especialmente no bulbo olfatório, hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral (Zhao e cols., 1999).

A produção da insulina no SNC ainda hoje é uma questão controversa. Alguns trabalhos vêm demonstrando a presença do gene que codifica a insulina no cérebro de embriões de camundongos (Deltour e cols., 1993; Deltour e cols., 1995), sugerindo um papel para a insulina durante o desenvolvimento cerebral. Outros grupos, analisando

cérebro de coelho, demonstraram que insulina é sintetizada localmente por células neuronais, a partir de um único gene (Schechter e cols., 1994; Devaskar e cols., 1994). Evidências adicionais têm apontado para a síntese de insulina em células neuronais, e ainda para a sua liberação após despolarização destas células (Clarke e cols., 1986). Por outro lado, há dados que contrariam estes estudos, demonstrando que em homogenatos de cérebro não foi detectado nenhum sinal de RNAm para insulina (Giddings e cols., 1985). Existe também um grande número de evidências que indicam que a insulina cerebral é oriunda do sistema periférico, sendo transferida através de um sistema de transporte mediado por receptor presente na barreira hemato-encefálica (Woods e cols., 2003; Banks, 2004). Após elevações agudas dos níveis de insulina plasmática, a concentração de insulina no líquido cérebro espinhal aumenta, sugerindo que os níveis de insulina no SNC são sintonizados com os periféricos. Assim, a produção de insulina no SNC é uma questão que ainda precisa ser respondida.

Alguns trabalhos vêm demonstrando a participação da insulina durante o neurodesenvolvimento, baseados em dados que demonstram o direcionamento do crescimento axonal, induzido por insulina em *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*. Os autores sugerem, que os receptores de insulina presentes no cone de crescimento dos neurônios (Song e cols., 2003; Dickson, 2003), percebem um gradiente de insulina e respondem por meio de indução da proliferação e migração das células, além de induzir a diferenciação das células em neurônios funcionais quando o contexto for apropriado (Song e cols., 2003; Dickson, 2003). Entretanto, ainda não está esclarecido, se este gradiente de insulina está presente no sistema nervoso de vertebrados.

Uma extensiva quantidade de dados tem sugerido que a insulina é um fator neurotrófico, por ser um promotor de sobrevivência neuronal (Valenciano e cols., 2006).

Fatores neurotróficos são essenciais para o crescimento, manutenção e sobrevivência celular. Em uma cultura de fatias de cerebelo de rato, a aplicação de insulina reduziu apoptose dos neurônios da camada granular externa (Tanaka e cols., 1995). De forma interessante, a aplicação de insulina em cultura de neurônios corticais preveniu contra a morte induzida por deprivação de soro (Ryu e cols., 1999). Estes estudos iniciais, que identificaram o efeito da insulina em promover a sobrevivência neuronal, foram estendidos com estudos que investigaram as vias de sinalização intracelular envolvidas.

Sabe-se que a ligação da insulina ao seu receptor em neurônios, assim como em órgãos periféricos (veja item I. 3.1), pode ativar duas cascatas de transdução de sinal paralelas identificadas como a via PI3K – PKB/Akt e a via clássica da MAPK. Uma inibição da via PI3K – PKB, mesmo após o tratamento com insulina, foi observada em culturas de neurônios de camundongos que não expressavam receptor de insulina especificamente nestas células, além de uma reduzida proteção contra apoptose induzida por cloreto de potássio (Schubert e cols., 2004). Estes achados confirmam que a ação da insulina é capaz de inibir apoptose, e que esta resposta é completamente dependente da presença do receptor de insulina. Entretanto, o cérebro destes camundongos não apresentou alteração estrutural ou de desenvolvimento. Porém, os autores discutem que a ausência de RI, *in vivo*, pode ser compensada por outros fatores neurotróficos (Schubert e cols., 2004). Evidências adicionais sugerem que a PKB é fundamental para mediar os efeitos da PI3K na sobrevivência neuronal, uma vez que a expressão da PKB ativa protegeu contra apoptose, ao contrário do que foi observado quando o seu dominante negativo, ou seja, a PKB inativa foi expressa (Rodgers and Theibert, 2002). Dados *in vivo*, demonstram que PKB ativa protege contra estresse hipóxico e toxicidade por óxido nítrico (Yamaguchi e cols., 2001). Uma vez ativada, a PKB protege contra os estímulos tóxicos por inibir proteínas que

pertencem a uma maquinaria apoptótica tal como, as proteínas Bad e caspase 9, proteínas quinases como a GSK3, e ainda, por bloquear a atividade transcricional de p53 (Brunet e cols., 2001).

I.3.4.1) Insulina e plasticidade sináptica

Uma nova função para a insulina no sistema nervoso central é o seu papel na plasticidade sináptica. Trabalhos recentes demonstram que a administração de insulina em indivíduos saudáveis, enquanto os níveis de glicose são constantes, melhora a formação de memória (Craft e cols., 1999; Craft e cols., 2003). Estas observações podem resultar do efeito direto da insulina sobre o hipocampo, uma vez que a formação da memória de curta duração após uma tarefa de aprendizado espacial, tem sido associada com o aumento de RNAm do receptor de insulina na área CA1 do hipocampo de ratos (Zhao e cols., 1999). Além disso, os níveis de proteína do receptor de insulina se encontram elevados em frações de membrana sináptica de células hipocámpais, após formação de memória de curta duração (Zhao e cols., 1999). Evidências adicionais demonstram que a insulina foi capaz de induzir o fortalecimento de sinapses (Huang e cols., 2004; van der Heide e cols., 2005). Estes mecanismos têm sido propostos como base para a formação do aprendizado e memória (Dou e cols., 2005).

Resultados *in vivo* bastante interessantes que confirmam esta hipótese demonstram que a sinalização de insulina é capaz de regular o número, a manutenção das sinapses e a plasticidade dendrítica. Neste estudo, os autores observaram que a insulina contribui não somente para o processamento da informação sensorial, mas também para a plasticidade

estrutural das células, que é extremamente necessária para a incorporação de neurônios nos circuitos cerebrais (Chiu e cols., 2008).

Duas formas opostas de modificações nas sinapses foram identificadas, LTP e LTD. A primeira é obtida seguida de estímulos de baixa frequência e um pequeno influxo de cálcio, enquanto que um estímulo de alta frequência e um grande influxo de cálcio induzem LTP (Stanton, 1996). O influxo de cálcio funciona como um segundo mensageiro modulando vias de sinalização envolvidas no fortalecimento da sinapse. A sinalização de insulina tem sido implicada nos mecanismos de LTP e LTD, por influenciar a atividade do receptor NMDA, os níveis de receptor do ácido gama-aminobutírico A (GABA (A)) na membrana plasmática e a ciclagem do receptor AMPA para a membrana (Wang and Salter, 1994; Wan e cols., 1997; Malenka, 2003). Durante a depressão da transmissão excitatória (LTD), a insulina facilita a internalização de receptores AMPA através da regulação de uma das subunidades deste receptor, a subunidade GluR2. Por outro lado, a LTP é facilitada pela inserção de receptores AMPA na sinapse. Essa expressão de AMPA é profundamente facilitada pela insulina, porém a regulação deste processo envolve uma subunidade diferente do processo de endocitose, a subunidade GluR1. O mecanismo que envolve a inserção de AMPA durante a LTP não é totalmente esclarecido, entretanto, o envolvimento de PI3-K neste processo vem sendo descrito. Dados demonstram que esta enzima é necessária para o aumento da expressão de AMPA na membrana, assim como para a indução de LTP (Man e cols., 2003).

A estimulação de fatias de hipocampo de rato com insulina induz um expressivo aumento da expressão de PSD95, de forma dependente da atividade de PI3-K (Lee e cols., 2005). Sabe-se que a PSD95 é uma proteína fundamental para ancorar uma série de receptores e proteínas importantes para a sinapse, e a regulação de sua expressão pode

fornecer um mecanismo molecular adicional para a modulação da plasticidade sináptica pela insulina.

I.4) Relação entre Doença de Alzheimer e resistência à insulina

A deficiência da via da sinalização de insulina nos sistemas periféricos e no cérebro tem sido implicada na doença de Alzheimer, diabetes e envelhecimento (Craft e cols., 1998; Biessels e cols., 2002; Craft and Watson, 2004). O envelhecimento está associado com a redução dos níveis de insulina e de seu receptor (Stolk e cols., 1997). Esta redução também foi observada no cérebro de pacientes com Alzheimer (Frolich e cols., 1998). Estudos adicionais em cérebros com DA, demonstram a redução de RNAm de diversos componentes importantes para a sinalização de insulina, incluindo a própria insulina e seu receptor, a PI3-K, PKB/Akt e a GSK3 β . Neste trabalho foi proposto pela primeira vez que a doença de Alzheimer possivelmente seria uma nova forma de diabetes, denominada de Diabetes tipo 3 (Steen e cols., 2005).

Como descrito anteriormente, sabe-se que os oligômeros de A β são potentes neurotoxinas, que se ligam nas sinapses disparando uma série de eventos que levam a profunda disfunção sináptica. Como os receptores de insulina estão presentes nas sinapses, e se encontram reduzidos no cérebro com DA, alguns estudos buscaram investigar o impacto dos oligômeros de A β sobre os receptores de insulina. Um trabalho pioneiro do nosso grupo neste campo demonstrou, em culturas de neurônios de hipocampo, que tratamentos curtos, com baixas doses de oligômeros, foi capaz de induzir a redistribuição dos RIs dos dendritos para o corpo celular. Consistente com a remoção destes receptores da membrana dendrítica, a responsividade à insulina também foi prejudicada, uma vez que as

células tratadas com os oligômeros apresentaram uma profunda redução da atividade tirosina quinase do RI (Zhao e cols., 2008). De forma interessante, outro grupo mostrou que os oligômeros de A β induzem a disfunção dos RIs, sugerindo que esta disfunção é o fator principal no mecanismo que leva a inibição da LTP (Townsend e cols., 2007).

Portanto, a disfunção da sinalização de insulina parece ser um importante aspecto da toxicidade induzida pelos oligômeros. Isso sugere que a resistência à insulina no cérebro de pacientes com DA ocorre em resposta a ação destas neurotoxinas, que podem causar uma forma específica de diabetes no cérebro.

Uma grande contribuição para este campo teve origem em outro trabalho de nosso grupo. A proposta deste trabalho era investigar se a insulina forneceria um mecanismo de proteção fisiológico contra a toxicidade dos oligômeros de A β . Utilizando culturas de neurônios hipocâmpais maduras, um ótimo modelo experimental para o estudo da neurobiologia de sinapses, demonstramos que a insulina bloqueou a ligação dos oligômeros aos neurônios, e este efeito foi totalmente dependente da atividade tirosina quinase do receptor de insulina (De Felice e cols., 2009). Isso sugere que insulina leva a internalização dos sítios de ligação dos oligômeros o que resulta na prevenção da remoção dos receptores de insulina da membrana dos neurônios. Além disso, o tratamento dos neurônios com insulina preveniu o aumento excessivo da produção de espécie reativas de oxigênio. Interessantemente, a deterioração das espinhas sinápticas induzidas pelos oligômeros foi totalmente prevenida pela insulina (De Felice e cols., 2009). Portanto, a insulina pode ter uma importante implicação terapêutica na doença de Alzheimer, prevenindo a ligação dos oligômeros às sinapses. Além disso, drogas que aumentam a sensibilidade à insulina poderiam servir como uma ferramenta poderosa na busca por novas abordagens terapêuticas para a DA.

I.5) Papel da exendina-4 na ativação de receptores do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1)

Sabe-se que uma complexa rede de sinais neurais e endócrinos ocorre em resposta às refeições, regulando a digestão, absorção e estoque de nutrientes ingeridos. Muitos desses sinais são gerados por propriedades físico-químicas dos nutrientes, quando estes passam através do intestino. A importância destes sinais foi descrita primeiramente por (MCINTYRE e cols., 1964), onde foi levantada a hipótese de que a absorção de glicose e os níveis de insulina estão mais elevados após a administração oral de glicose, em comparação com a administração intravenosa da mesma dose de glicose em humanos. Segundo o autor, o aumento da secreção da insulina em resposta aos níveis elevados de glicose, foi devido a produção de hormônios no intestino, estimulado pelo carregamento de nutrientes. O primeiro hormônio descrito foi o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP, do inglês *glucose-dependent insulintropic polypeptide*), e uma década depois, o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1, do inglês *glucagon-like peptide-1*) (Kreyman e cols., 1987). Ambos são secretados no intestino, sendo que o primeiro por células K do duodeno, e o segundo por células L da mesma região.

O GLP-1 resulta da clivagem pós-traducional do produto do gene do glucagon, (préproglucagon), pela enzima convertase PC1/3 (Dhanvantari e cols., 2001). A forma predominante, biologicamente ativa encontrada em humanos é o GLP-1 (7-37), embora pequenas quantidades da outra forma ativa, GLP-1 (7-36) também sejam detectadas. A ação do GLP-1 tem sido extensivamente estudada por mais de duas décadas, devido a sua capacidade de reduzir os níveis plasmáticos de glicose e aumentar os níveis de insulina, os

quais são extremamente importantes para pacientes com diabetes tipo II. Com isso, estratégias terapêuticas para a ativação dos receptores de GLP-1 vêm sendo desenvolvidas. Este peptídeo apresenta uma rápida degradação, quando presente no soro, pela enzima dipeptidil peptidase. Esta enzima, presente no soro e na membrana das células, cliva o GLP-1 (7-36) na sua porção N-terminal, produzindo fragmento de GLP-1 na sua forma inativa, o GLP-1 (9-36). Por isso, grandes esforços estão voltados para aumentar a meia-vida biológica do GLP-1, e com isso sua eficácia *in vivo* (Deacon e cols., 1995). Neste sentido, a exendina-4 (*exendin-4* ou como também é chamando *exenatide*), um agonista de GLP-1, caracterizado inicialmente na saliva de um lagarto *Gila Monster*, apresenta uma meia vida maior por não possuir sítio para ação da enzima dipeptidil peptidase (Knudsen, 2004). Dessa forma, devido ao seu potente e prolongado efeito insulínico, esse peptídeo foi recentemente aprovado para o tratamento de diabetes tipo 2. Outro composto, também caracterizado a partir da saliva do lagarto, exendina 9-39, um antagonista do receptor GLP-1, foi de grande utilidade na determinação da especificidade dos efeitos deste receptor.

O receptor de GLP-1 (GLP-1r) é uma proteína transmembrana, acoplada a proteína G (GPCR, do inglês *G-protein coupled receptor*). Foi inicialmente clonado a partir de células das ilhotas pancreáticas de rato (Thorens, 1992) e mais tarde identificado no pâncreas humano (Dillon e cols., 1993). Estes receptores acoplados a proteína G estão agrupados em quatro principais classes, baseados na similaridade de suas seqüências, sendo estas, A, B, C e a família dos receptores Frizzled (Foord e cols., 2005). O receptor do GLP-1 pertence a uma subclasse da família dos receptores de glucagon, que por sua vez se encontram dentro da classe B. Além do GLP-1, o próprio glucagon também pode se ligar ao GLP-1r, entretanto com uma afinidade mil vezes menor do que o GLP-1 (Fehmann e

cols., 1994). Ao se ligar, este peptídeo promove a ativação da adelinato ciclase, aumentando da produção de AMP cíclico. Este é o principal mediador da ação do GLP-1 sobre os eventos moleculares de secreção de insulina nas células β (Hay e cols., 2005).

Podemos citar outras vias ativadas pelo GLP-1, como a PI3-K que é uma enzima implicada em múltiplos eventos das células β como crescimento, sobrevivência e metabolismo. Existem ainda, algumas evidências que agonistas de GLP-1r podem ativar diretamente IRS-2 (do inglês, *insulin receptor substrate 2*) por induzir a fosforilação deste substrato e assim, recrutar a subunidade regulatória da PI3-K (Trumper e cols., 2000). A expressão de IRS-2 também pode ser induzida por GLP-1, através da ativação do fator de transcrição CREB pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (Jhala e cols., 2003). Desta forma, a partir de diferentes vias, o sinal induzido pelo GLP-1 é propagado estimulando a secreção de insulina e a homeostase da glicemia. (Fig. 4)

1.5.1) Efeitos do GLP-1 no Sistema Nervoso Central

A produção e secreção de GLP-1 também ocorrem em uma pequena população de neurônios (Vrang e cols., 2007). A identificação dos receptores de GLP-1 em diferentes regiões do cérebro estimulou diversos estudos para melhor entender as funções deste peptídeo. Um corpo grande de evidências suporta a hipótese do papel central, durante o aprendizado e memória, exercido pelo GLP-1 (Mattson e cols., 2003). Dados recentes, demonstram que infusões intracerebroventriculares de GLP-1 foram capazes de otimizar a memória e o aprendizado de ratos (During e cols., 2003). Embora a base molecular dos mecanismos de aprendizado e memória ainda seja foco de muitos estudos, são bem claros os processos que envolvem mudanças estruturais e funcionais nas sinapses, como as vias de

sinalização que incluem cálcio, AMPc e o fator de transcrição CREB. Sabe-se que através dos GLP-1r estas vias de sinalização podem ser ativadas.

De forma interessante, trabalhos recentes vêm demonstrando que o peptídeo GLP-1 também exerce um papel neuroprotetor, uma vez que foi capaz de prevenir a morte neuronal diante de um quadro de excitotoxicidade, devido a uma ativação excessiva dos receptores de glutamato (Perry e cols., 2002). Adicionalmente a este dado, este efeito protetor também foi observado contra o dano cerebral excitotóxico causado por crises epiléticas em camundongos modelos (During e cols., 2003).

O potente agonista de GLP-1r, exendina-4, foi capaz de prevenir contra insultos oxidativos e metabólicos em modelos celulares e animais de isquemia e de doença de Parkinson (Li e cols., 2009). Além disso, estes agonistas de GLP-1r reverteram a inibição de LTP induzida por oligômeros de A β (Gault and Holscher, 2008). Uma evidência adicional do papel central do GLP-1r na plasticidade sináptica é suportada por dados interessantes que demonstram o déficit cognitivo apresentado por animais que não expressam receptor de GLP-1 (Abbas e cols., 2009).

Portanto, estes dados sugerem o promissor papel do GLP-1 como agente terapêutico para o tratamento de diferentes condições neurodegenerativas, incluindo isquemia, doença de Parkinson e principalmente a doença de Alzheimer.

I.6) Transporte axonal

O transporte intracelular é fundamental para todas as células de mamíferos, especialmente para os neurônios. Um típico neurônio tem uma estrutura altamente polarizada, com corpo celular diversos dendritos curtos e afilados além de um longo e fino

axônio. A maioria das proteínas que são necessárias ao axônio e ao terminal sináptico são sintetizadas no corpo celular e transportadas ao longo do axônio em organelas membranosas ou complexos protéicos (Grafstein and Forman, 1980). Embora as proteínas dendríticas também sejam transportadas do corpo celular, diversos RNAs específicos, são transportados até os dendritos para suportar a síntese protéica local (Job and Eberwine, 2001). Além destes, outros componentes celulares são transportados pelos axônios, sendo estes, endossomos, mitocôndrias, vesículas sinápticas e vesículas secretoras densas (DCV's, do inglês *Dense Core Vesicles*). Estas são formadas no corpo celular, e percorrem grandes distancias através de axônios e dendritos, até os sítios pré e pós sinápticos, onde finalmente liberam seu conteúdo de proteínas e neuropeptídeos (Wu e cols., 2004). A distância percorrida pelas vesículas são mais longas, em comparação com outros tipos celulares, pois o axônio de um neurônio motor humano, pode medir cerca de 1 metro de comprimento (Stokin and Goldstein, 2006). O mecanismo de liberação das vesículas em seus sítios de ação é baseado no transporte de longo alcance sobre os microtúbulos.

Em ambos, dendritos e axônios, os microtúbulos são orientados longitudinalmente (Hirokawa, 1982), e servem como trilhos ao longo dos quais, organelas e macromoléculas podem ser transportadas (Hirokawa, 1998) (Fig. 5). Os microtúbulos são estruturas protéicas que fazem parte do citoesqueleto das células, são filamentos longos, como cilindros ocos com aproximadamente 25nm. São constituídos de um polímero de α e β -tubulina que é dinâmico e instável (Desai and Mitchison, 1997). Esta dinâmica é controlada por proteínas associadas à microtúbulos (MAP, do inglês *microtubules-associated proteins*) *in vivo* e *in vitro* (Stokin and Goldstein, 2006). Evidências com relação aos mecanismos que regulam a direção do transporte surgem da determinação da polaridade dos microtúbulos, altamente organizadas nos axônios. A polaridade dos microtúbulos direciona

o transporte da região proximal (próximo ao corpo celular) para a região distal (próximo a terminação pré-sináptica) dos axônios (Stokin and Goldstein, 2006). Essas regiões de diferentes polaridades são reconhecidas por proteínas motoras, como as kinesinas e dineínas, as quais transformam energia química em movimento mecânico (Lawrence e cols., 2004).

Enquanto o transporte axonal anterógrado regulado por diversas proteínas motoras da família das kinesinas, estudos sugerem que as dineínas sejam as principais proteínas motoras envolvidas no transporte axonal retrógrado (Stokin and Goldstein, 2006). A dineína é composta por duas cadeias pesadas, duas cadeias leves e duas cadeias intermediárias leves. Acredita-se que o transporte mediado por dineína seja regulado pela sua interação com o complexo dinactina, o qual consiste de diversas proteínas (Schroer, 2004).

A regulação da atividade das kinesinas e das dineínas, assim como a regulação do transporte axonal, é pouco compreendida até os dias de hoje. Em princípio, a regulação pode ocorrer em um dos diversos passos, incluindo o reconhecimento do cargo e a ligação deste a proteína motora, a velocidade do transporte, e ainda, o reconhecimento do destino correto pelo complexo proteína motora-cargo. Dados demonstram que a kinesina-1 pode ser regulada diretamente pela ligação do cargo (Friedman and Vale, 1999).

Dentre muitos cargos e parceiros de ligação identificados para as proteínas motoras anterógradas e retrógradas, alguns parecem estar envolvidos com um mecanismo de regulação. Estes parceiros incluem a proteína precursora amilóide (APP) (Kamal e cols., 2000), a proteína c-Jun N-terminal kinase (JNK) e as proteínas que com ela interagem (JIP1, JIP2, JIP3/*Sunday driver*) (Cavalli e cols., 2005). Evidências adicionais sugerem um

importante papel da fosforilação na regulação de proteínas motoras, envolvendo as quinases glicogênio sintase cinase 3 β (GSK3 β) e a quinase dependente de ciclina 5 (CDK 5).

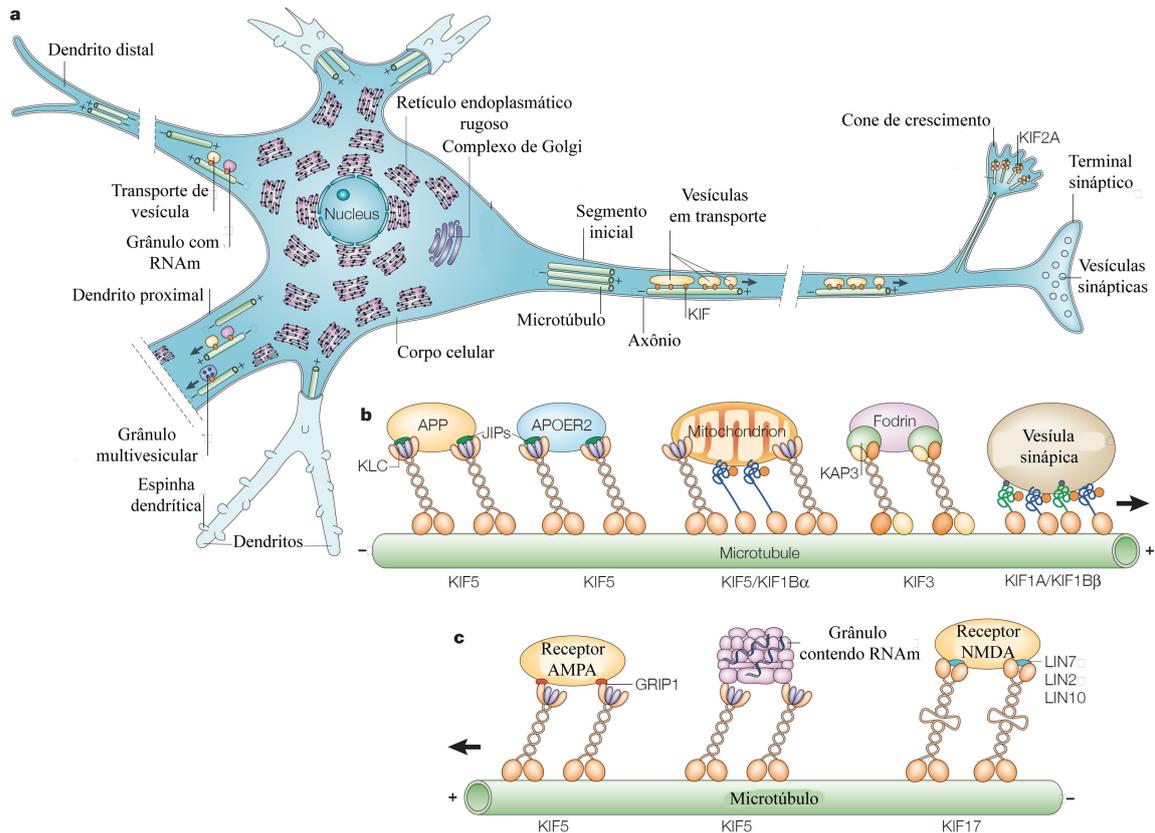


Figura 5: Transporte axonal e dendrítico. **a.** Um típico neurônio, projetando diversos dendritos (esquerda) e um único axônio do corpo celular. **b.** Proteínas da família das quinesinas transportando vesículas contendo APP, apolipoproteína E, mitocôndrias e vesículas sinápticas, no sentido anterógrado **c.** Receptores AMPA e NMDA, grânulos de RNAm transportados por quinesinas, no sentido retrógrado, nos dendritos. Adaptado de Hirokawa and Takemura, 2005.

I.6.1) Transporte axonal, envelhecimento e Doença de Alzheimer

Estudos sugerem que no envelhecimento podem ocorrer problemas no transporte axonal, já que existe uma redução dos trilhos de microtúbulos (Cash e cols., 2003), assim como mudanças na distribuição de proteínas associadas à microtúbulos, como a proteína tau e neurofilamentos (Niewiadomska and Baksalerska-Pazera, 2003; Uchida e cols., 2004). Outro trabalho observou um aparente acúmulo de proteínas ao longo do axônio, como a APP (Kawarabayashi e cols., 1993). O entendimento dessas mudanças relacionadas com a idade na estrutura e função dos axônios permanece não esclarecido, pois em particular não se sabe se todas as proteínas de transporte são afetadas, ou se somente algumas vias de sinalização são prejudicadas no envelhecimento.

Existe uma considerável quantidade de dados consistentes com a hipótese de que a deficiência do transporte axonal desempenha um papel central na patogênese de algumas doenças neurodegenerativas, incluindo Huntington (Trushina e cols., 2004), ALS (LaMonte e cols., 2002) e da DA (Terry, 1996). Uma evidência da ampla patologia axonal é a presença de anormalidades como o intenso acúmulo de diversas moléculas ao longo do trajeto do axônio, como a APP (Cras e cols., 1991) e seus metabólitos, neurotransmissores e proteínas relacionadas, neurofilamentos, tau e glicogênio, assim como uma redução do trilhos de microtúbulos (Cash e cols., 2003). Dados sugerem que os defeitos axonais podem coincidir com estágios iniciais da DA (Stokin e cols., 2005). Camundongos que possuem uma expressão reduzida de kinesina-1 desenvolveram defeitos axonais, assim como, o aumento excessivo da produção de A β e da deposição de placas (Stokin e cols., 2005). Evidências vêm demonstrando que o A β pode induzir anormalidades axonais (Pike e cols., 1992), contribuindo diretamente para a deficiência no transporte axonal (Hiruma e cols., 2003). A hiperfosforilação de tau, um marcador da doença de Alzheimer, pode também afetar diretamente o transporte axonal de APP e de outras moléculas (Stamer e cols., 2002).

Em adição a estes dados, drogas que estabilizam os microtúbulos foram capazes de prevenir os déficits de transporte observados em camundongos transgênicos para tau (Trojanowski e cols., 2005). De forma bastante interessante, o cérebro de indivíduos com DA apresentaram uma significativa redução do transporte axonal (Dai e cols., 2002).

Dados recentes muito interessantes do nosso grupo demonstram que o tratamento de neurônios hipocâmpais com oligômeros do peptídeo A β é capaz de reduzir de forma significativa o transporte axonal (Decker, H. e cols, submetido), demonstrando um novo impacto dos oligômeros nos neurônios.

I.7) Doença de Alzheimer e Inflamação

A presença de um processo inflamatório na patogênese da doença de Alzheimer (DA) foi descrito inicialmente a mais de 20 anos, e apesar de duas décadas de estudos, muitas questões centrais envolvendo a inflamação na DA permanecem sem resposta (Akiyama e cols., 2000). Por exemplo, ainda não é bem compreendido como e quando o quadro inflamatório surge no cérebro destes pacientes. Evidências diretas do papel do processo inflamatório na neurodegeneração da DA surgem de estudos da pesquisa básica e clínica. Entretanto, estes estudos não possuem uma conclusão com respeito às abordagens terapêuticas com o uso de anti-inflamatórios que possam retardar a progressão do déficit cognitivo desta doença (McGeer e cols., 1996). Assim, o papel inflamatório na DA é alvo de intensas investigações. Estudos apontam para o acúmulo do peptídeo β -amilóide como um indutor do processo de neuroinflamação, que vem sendo associado com a neurodegeneração e progressão da doença de Alzheimer. (McGeer and McGeer, 2003; Griffin, 2006; Eikelenboom e cols., 2006).

Um dos eventos neurotóxicos induzidos pelo A β é a exacerbada ativação de microglia com elevação dos níveis de mediadores proinflamatórios como citocinas e radicais livres (McGeer e cols., 2006). Dados vêm demonstrando que a ativação da microglia contribui para o dano neuronal encontrado no cérebro de pacientes acometidos pela DA, assim como no cérebro de animais transgênicos modelos para esta doença (Britschgi and Wyss-Coray, 2007; Floden e cols., 2005; van and Kadish, 2005). Tal efeito, é provavelmente devido à liberação exacerbada de uma variedade de mediadores citotóxicos pela microglia induzido pelo peptídeo A β . Entretanto, o preciso mecanismo pelo qual o A β inicia a resposta inflamatória mediada pela microglia, ainda é desconhecido e vem sendo foco de interesse em muitos estudos (Lue e cols., 2001).

I.7.1) Mediadores celulares de Inflamação no SNC

Microglias são pequenas células gliais que constituem aproximadamente 10% das células do sistema nervoso central (SNC), originadas a partir do mesoderma. Suas características morfológicas e funcionais são altamente reguladas *in vivo*, resultando em diferentes estados intermediários de ativação. Estas células são fortemente estabelecidas como um elemento celular fundamental no SNC, além de agir como um integrante do sistema imune inato do cérebro e da medula espinhal (Streit and Kincaid-Colton, 1995; Streit e cols., 2005). Atualmente, é bem aceito que a função das microglias é servir como um sensor de injúrias patológicas, uma vez que estas células estão envolvidas na maioria, se não em todas as patologias do SNC (McGeer e cols., 1993; Stoll and Jander, 1999). Entretanto, a forte atenção para a microglia em condições patológicas, oculta o fato de que estas células desempenham um papel importante no cérebro saudável. Dados recentes

demonstram que as microglias podem potencialmente influenciar o processamento de informação no SNC, seja indiretamente por suas interações com os astrócitos, assim como diretamente por suas interações com as sinapses (Wake e cols., 2009). Além disso, estas células também são capazes de secretar fatores tróficos, como o fator neurotrófico derivado da glia (*glia-derived neurotrophic factor, GDNF*) que exerce uma potente função neuroprotetora (Yan e cols., 2003).

Embora as microglias realizem uma função neurotrófica no cérebro normal, seu potencial neurotóxico vem sendo destacado na DA. Em situações patológicas, tal como doenças neurodegenerativas, derrame, injúria traumática e invasão tumoral, estas células tornam-se ativadas, migram e circundam a área contendo as células danificadas e mortas, removendo os restos celulares da região (Fetler and Amigorena, 2005). Uma vez estimulada, em resposta a eventos neurodegenerativos, as microglias liberam uma variedade de mediadores proinflamatórios, incluindo citocinas, espécies reativas de oxigênio, fatores complemento e óxido nítrico (NO). Esses mediadores podem levar à disfunção neuronal e morte celular, possivelmente criando um ciclo vicioso (Griffin e cols., 1998). De forma interessante, tanto o peptídeo β -amilóide quanto a proteína precursora amilóide (APP) agem como potentes ativadores da microglia (Barger and Harmon, 1997). Uma via dependente de fator nuclear kappa B (NF κ B), necessária para a transcrição dos genes das citocinas, é estimulada pelo A β (Combs e cols., 2001). Coletivamente, esses achados sugerem que a ativação da microglia pela exposição ao A β , pode ser um passo crucial no início do processo de inflamação na DA. Por outro lado, é importante destacar os aspectos benéficos da ativação da microglia na DA, pois alguns estudos sugerem que esse tipo celular pode reduzir o acúmulo de A β , aumentando sua remoção e degradação (Frautschy e cols., 1998).

Similarmente as microglias, os astrócitos participam da remoção e degradação de A β (Wyss-Coray e cols., 2003), além de fornecer um suporte trófico aos neurônios (Seth and Koul, 2008). Recentes achados demonstram a presença de A β intracelular nos astrócitos, possivelmente originado da fagocitose de dendritos e espinhas sinápticas em degeneração. Por outro lado, outros trabalhos demonstram que os astrócitos também podem servir como uma fonte para A β , uma vez que apresentam uma superexpressão de β -secretase, em resposta ao estresse crônico (Rossner e cols., 2005). Portanto, ainda não está totalmente esclarecido se a ativação dos astrócitos promove a remoção ou a geração do A β , porém a sua contribuição no processo inflamatório vem sendo confirmada, através de dados que demonstram que os astrócitos expressam óxido nítrico sintase induzível (iNOS), favorecendo a neurotoxicidade mediada por óxido nítrico (NO) (Heneka e cols., 2001). Somando-se a isto, os astrócitos também expressam outros mediadores proinflamatórios como, por exemplo, IL-1, IL-6, TGF β -1, 2 e 3, ICAM-1, prostaglandinas, COX-2.

De forma muito interessante, trabalhos recentes demonstram que a ativação dos astrócitos e microglias ocorre mesmo na ausência de uma deposição focal de A β . Suportando esta hipótese, um estudo clínico detectou a ativação de células astocitárias em um estágio muito precoce da doença de Alzheimer (Cagnin e cols., 2001). Em paralelo com estes dados, estudos em animais transgênicos modelos para a DA demonstram que a ativação glial precede a deposição de placas amilóides. Segundo este estudo, o déficit cognitivo e a produção de citocinas gliais ocorrem em resposta aos oligômeros ou protofibrilas de A β (White e cols., 2005; Heneka e cols., 2005).

Adicionalmente as células gliais, podemos citar os neurônios. Tradicionalmente acreditava-se que os neurônios eram simples espectadores da neuroinflamação. Entretanto, recentes evidências apontam para estas células como importantes participantes desse

processo, capazes de produzir potentes mediadores inflamatórios. Dentre estes, podemos citar COX, IL-1 β , IL-6 e TNF α (Akiyama e cols., 2000). Veremos mais a diante, que esses mediadores inflamatórios encontram-se significativamente elevados no cérebro acometido pela DA, sugerindo deste modo, que os próprios neurônios podem exacerbar as reações inflamatórias ao seu redor, e assim contribuir para sua própria disfunção na DA.

I.7.2) Mediadores moleculares inflamatórios

Um crescente número de mediadores inflamatórios tem sido observado no cérebro de pacientes acometidos pela DA (Heneka and O'Banion, 2007). Praticamente todas as citocinas que vem sendo estudadas na DA, encontram-se em níveis elevados em comparação com indivíduos controle, saudáveis (Heneka and O'Banion, 2007). Tais moléculas, como as citocinas, desempenham um mecanismo de sinalização intercelular e intracelular sobre as microglias e os astrócitos muito semelhante ao mecanismo descrito para a sinalização inflamatória em células do sistema periférico (Akiyama e cols., 2000). Aqui nós descreveremos apenas a citocina abordada neste trabalho, o fator de necrose tumoral α , que vem sendo uma das mais estudadas na neuroinflamação da doença de Alzheimer.

I.7.2.1) Fator de necrose tumoral alfa (TNF α)

Por volta de trinta anos atrás, a citocina solúvel denominada fator de necrose tumoral α (TNF α) foi identificada (Wajant e cols., 2003), sendo produzida sob ativação do sistema imune, a qual é capaz de exercer significativa citotoxicidade sobre diversas

linhagens celulares tumorais, além de causar necrose tumoral em certos modelos animais (Haranaka e cols., 1984). Em 1984, TNF α foi clonado (Marmenout e cols., 1985), e anos mais tarde foram identificados dois receptores de membrana nos quais esta citocina pode se ligar (Bazan, 1993). Atualmente TNF α é reconhecido como membro de uma grande família de citocinas. TNF α é produzido como uma proteína transmembrana organizada como homotrimeros estáveis (Tang e cols., 1996). Da forma integrada a membrana é liberada a citocina homotrimérica solúvel (TNFs) a partir da clivagem proteolítica pela enzima conversora de TNF (TACE, *TNF alpha converting enzyme*). O TNFs trimérico, se dissocia na faixa de concentração abaixo de nanomolar, perdendo assim sua bioatividade (Tang e cols., 1996).

Os membros da família TNF exercem suas funções biológicas através de sua interação com seus receptores de membrana, compreendendo a família dos receptores de TNF (TNF-R) (Locksley e cols., 2001). Atualmente, dois receptores de TNF são conhecidos, receptor de TNF tipo 1 (TNF-R1; CD120a; p55/60) e receptor de TNF tipo 2 (TNF-R2; CD120b; p75/80), que se ligam tanto ao TNF solúvel quanto ao TNF integrado na membrana (Grell e cols., 1995). TNF-R1 é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos, enquanto a expressão de TNF-R2 é altamente regulada e tipicamente encontrada em células do sistema imune (Locksley e cols., 2001). Na vasta maioria das células, TNF-R1 parece ser o principal mediador da sinalização de TNF, já o TNF-R2 realiza o principal papel no sistema linfóide (Locksley e cols., 2001). O domínio extracelular dos receptores pode ser proteoliticamente clivado produzindo fragmentos de receptores solúveis com alta capacidade de neutralização (Wallach e cols., 1991).

TNF α é principalmente sintetizado pelos macrófagos, mas também por uma ampla variedade de outros tecidos incluindo células linfóides, endoteliais, fibroblastos e neurais,

exercendo um largo espectro de bioatividade (Wajant e cols., 2003). Em geral, essa citocina pode ser considerada como um dos principais mediadores proinflamatórios. De forma interessante seja em situações fisiológicas ou patológicas, o TNF desempenha uma marcante dualidade funcional, uma vez que está envolvido tanto na expansão ou regeneração dos tecidos, quanto na danificação tecidual.

A ligação do TNF ao TNF-R1 dispara uma série de eventos intracelulares que finalmente resultam na ativação de dois principais fatores de transcrição, o fator nuclear κ B (NF- κ B, *nuclear factor κ B*) e c-Jun, os quais são responsáveis por induzir a expressão de genes importantes em diversos processos celulares, como crescimento e morte celular, desenvolvimento, respostas imunes, inflamatórias e de estresse celular. Atualmente, sabe-se que a cascata de sinalização de TNF α ativa proteínas MAPK, IKK β e ainda JNK, dentre outras (Chen and Goeddel, 2002).

De forma interessante, TNF regularmente induz a ativação de proteínas quinase ativadas por estresse (SAPK, *stress-activated protein kinase*)/c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Chen and Goeddel, 2002). Sob ativação, estas proteínas se deslocam para o núcleo e estimulam a atividade transcricional de fatores de transcrição, como c-Jun e ATF2 por fosforilação no seu domínio de ativação amino-terminal (Chen and Goeddel, 2002). Entretanto, JNK possui outras funções não relacionadas com a fosforilação de c-Jun, desempenhando em papel importante em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, prevenção de apoptose, como também o contrário, induzindo disfunção e morte celular em situações de estresse (Chang and Karin, 2001).

Recentemente JNK tem surgido com um potente regulador da resistência a insulina em tecidos periféricos em casos de obesidade (Hirosumi e cols., 2002). Nesta condição, a

atividade de JNK encontra-se elevada em tecidos como fígado, músculo esquelético, e tecido adiposo, provavelmente devido ao aumento dos níveis de TNF α .

I.7.2.2) Fator de necrose tumoral e a doença de Alzheimer

Após três décadas de pesquisa, TNF α tem sido estabelecido como um regulador fundamental de múltiplos de mecanismos fisiológicos em órgãos e sistemas, incluindo o cérebro. Esta importante citocina vem sendo descrita recentemente, como uma das poucas moléculas já descritas capazes de modular atividade sináptica, conhecidas como gliotransmissores (Halassa e cols., 2007). A função do TNF α como gliotransmissor, ajuda a explicar o profundo efeito sináptico desta citocina, demonstrado em uma variedade de modelos experimentais (Beattie e cols., 2002). Suportando esta hipótese, dados recentes demonstram um significativo efeito de TNF α sobre a transmissão sináptica em modelos de fatias de hipocampo de rato. Neste trabalho, os autores demonstram que TNF induz uma inibição da potenciação de longa duração, importante mecanismo de plasticidade sináptica, e ainda, que o grau de inibição foi tempo e dose dependente. Estudos posteriores confirmaram estes resultados. (Tancredi e cols., 1992; Albenis and Mattson, 2000). Outro grupo demonstrou que TNF α produzido por células gliais, afetam diretamente a força sináptica por modular o tráfego de receptores AMPA, além de exercer um efeito sobre a transmissão glutamatérgica (Stellwagen e cols., 2005; Pickering e cols., 2005). O dramático efeito sináptico induzido pelo TNF α , se correlaciona profundamente com as crescentes evidências que apontam a disfunção sináptica como a questão central da doença de Alzheimer, especificamente com respeito ao déficit de memória. Um estudo demonstrou que a inibição da LTP induzida pelos oligômeros do peptídeo β -amilóide é mediada pelo

TNF α (Rowan e cols., 2007; Wang e cols., 2005). Além disso, eles demonstraram que esse efeito inibitório da LTP pode ser prevenido por ligantes que neutralizam TNF solúvel (Rowan e cols., 2007). De forma similar, outro grupo demonstrou que a inibição de TNF α previne a deficiência da memória de reconhecimento induzida pelo A β em modelos animais (Alkam e cols., 2008). Interessantemente, um estudo clínico demonstrou que os níveis de TNF α estão vinte e cinco vezes mais altos em pacientes com DA, em comparação com indivíduos controle (Tarkowski e cols., 1999). Ainda neste trabalho, foi observado que os pacientes não apresentavam alterações séricas desta citocina, sugerindo uma alteração somente no SNC (Tarkowski e cols., 1999). Alguns anos mais tarde, esse mesmo grupo demonstrou que o elevado nível de TNF α no fluido cérebro espinhal estava correlacionado com a progressão da doença. Adicionalmente, pacientes com transtorno cognitivo leve apresentavam aumento significativo de TNF α , indicando a participação desta citocina em eventos iniciais da patogênese da DA (Tarkowski e cols., 2003).

Diante de todas as evidências apresentadas até o momento, seria razoável pensar numa correlação entre a inibição da atividade sináptica induzida pelos oligômeros e pelo TNF α e a sinalização por insulina nos neurônios. Como de fato, já foi demonstrado que oligômeros solúveis de A β induzem a disfunção da sinalização por insulina em neurônios hipocámpais (Zhao e cols., 2008; De Felice e cols., 2009), e esta, exerce um papel fundamental nos processos de aprendizado e memória (Dou e cols., 2005). Além disso, sabe-se que elevados níveis de TNF α podem induzir um quadro de resistência a insulina no sistema periférico (Hotamisligil e cols., 1994).

II) OBJETIVOS

O objetivo desta dissertação foi estudar o impacto dos oligômeros de peptídeo A β sobre a sinalização de insulina, em culturas primárias neuronais de hipocampo de rato, buscando compreender melhor as bases moleculares da resistência a insulina no sistema nervoso central. Os objetivos específicos foram:

1. Investigar o efeito dos oligômeros de A β sobre a função do substrato do receptor de insulina -1 (IRS-1), mediador imediato para propagação da sinalização de insulina.
2. Investigar possíveis mecanismos de ação subjacentes aos efeitos observados sobre a função do IRS-1, através do uso de ferramentas farmacológicas.
3. Investigar o papel da sinalização de insulina na manutenção de uma função fisiológica importante da célula neuronal, o transporte axonal, diante do efeito tóxico dos oligômeros.
4. Testar se a insulina, a exendina-4 e o infliximab protegem contra o impacto dos oligômeros de A β na sinalização de insulina.

III) MÉTODOS

Descrições dos métodos específicos utilizados no desenvolvimento da parte experimental desta dissertação encontram-se no artigo em fase final de redação anexado em “Resultados”. Nesta seção serão descritos, de forma mais detalhada, algumas metodologias rotineiramente usadas nessa tese.

III.1) Preparação e caracterização dos Oligômeros de A β

A β 1-42 (Bachem Inc., Torrance, CA) foi solubilizado a 1 mM em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Merck) gelado e a solução límpida e incolor resultante foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos. A solução foi então colocada em gelo por 10 minutos e aliquoteada, em fluxo laminar, em microtubos. Os microtubos foram deixados abertos na capela de fluxo laminar durante 12 horas para evaporação do HFIP. A eliminação completa do HFIP foi feita por centrifugação em SpeedVac® por 10 minutos. As alíquotas contendo os filmes de A β foram estocadas a -20 °C para utilização posterior.

As preparações dos oligômeros de A β foram feitas, a partir destes estoques, segundo protocolo previamente descrito (Lambert e cols, 1998). A cada preparação dos oligômeros, uma alíquota de A β foi ressuspensa em dimetilsulfóxido anidro (DMSO; Sigma, St.

Louis, MO) de forma a obter uma solução a 5 mM. Esta solução foi diluída em PBS estéril a 100 μ M e incubada a 4 °C por 24 horas. Uma amostra de mesmo volume de

DMSO 2% em PBS foi preparada e incubada a 4 °C por 24 horas, e usada experimentalmente como controle (veículo). Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 14.000 g por 10 minutos a 4 °C para remoção de agregados insolúveis de A β . O sobrenadante da centrifugação, contendo os oligômeros, foi mantido a 4 °C até a sua utilização em um período máximo de até 48 horas após o preparo. Para determinar a concentração dos oligômeros nas preparações, utilizou-se o método de BCA (Pierce, Rockford, IL).

Como são metaestáveis, as preparações dos oligômeros, realizadas semanalmente no laboratório, são rotineiramente analisadas por *Western blot* e cromatografia de gelfiltração para caracterizar as espécies oligoméricas presentes.

III.1.1) Gel-filtração por HPLC

As análises foram feitas com uma coluna de sílica SynChropak® GPC 100 com as seguintes características: dimensão da coluna: 250 x 4,6 mm; tamanho do poro: 100 Å; limite de exclusão para proteínas: 3.000-300.000 kDa. A fase móvel usada foi PBS pH 7, filtrado através de membrana de nitrocelulose Millipore (Billerica, MA) 0,45 μ m, mantido em gelo durante toda a análise. As análises foram feitas através de cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography*, HPLC), com detecção simultânea de absorção a 280 nm e fluorescência com excitação a 275 nm e emissão a 305 nm.

Antes da injeção da amostra dos oligômeros, a coluna foi lavada durante 1 hora com água Milli-Q® e equilibrada por 1 hora com a fase móvel, ambas com fluxo de 0,5

mL/min. Inicialmente, 50 μ L de veículo (DMSO 2% em PBS) foram injetados, com fluxo de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 15 minutos. Em seguida, a coluna foi re-equilibrada com a fase móvel durante 15 minutos e 50 μ L dos oligômeros foram injetados, e a análise feita com os mesmos parâmetros usados para o veículo. Os dados das cromatografias foram transferidos para o programa Microsoft® Excel 2002, onde os cromatogramas foram preparados para relatórios semanais de caracterização das preparações.

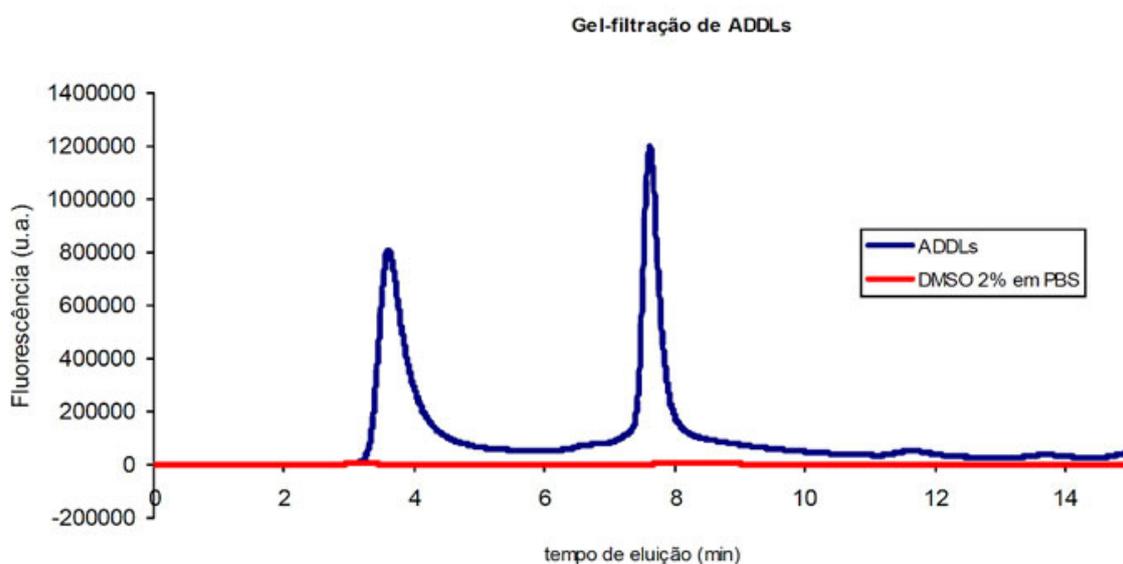


Figura 6: Cromatograma representativo de gel-filtração dos Oligômeros (ADDLs). Através da gel-filtração é possível detectar duas populações de agregados. A primeira, formada por oligômeros de alto peso molecular (50-100 kDa), elui entre 3,5 – 4 minutos. Agregados de 2-3 monômeros eluem mais tarde, entre 7,5 – 8 minutos.

III.1.2) *Western blot* para Oligômeros de A β (ADDLs)

Amostras das preparações dos oligômeros foram adicionadas a tampão de amostra e resolvidas por eletroforese em gel de gradiente de 10–20% de acrilamida (Invitrogen) com tampão de corrida Tris/Tricina/SDS, a 120 V por 60 minutos à temperatura ambiente. O material no gel (20 pmol de A β /canaleta) foi eletrotransferido para membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) a 100 V por 1 hora a 4 °C, usando tampão contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol, 0,02% SDS, pH 8,3. As membranas foram bloqueadas com BSA 3 % em tampão Tris-HCl 20 mM contendo Tween-20 0,1 % (TBS-T) por 1 h à temperatura ambiente. Um anticorpo monoclonal murino específico contra oligômeros de A β (NU1), gentilmente doado pelo Dr. William Klein, da Universidade Northwestern (Evanston, USA), foi diluído a 1 μ g/mL em BSA 3 %/TBS e incubado com as membranas por 90 minutos. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:50.000 (em TBS-T) por 1 hora. As membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com TBS-T e reveladas com o substrato SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Pierce, Rockford, IL) diluído 1:1, e expostas em filme Kodak.

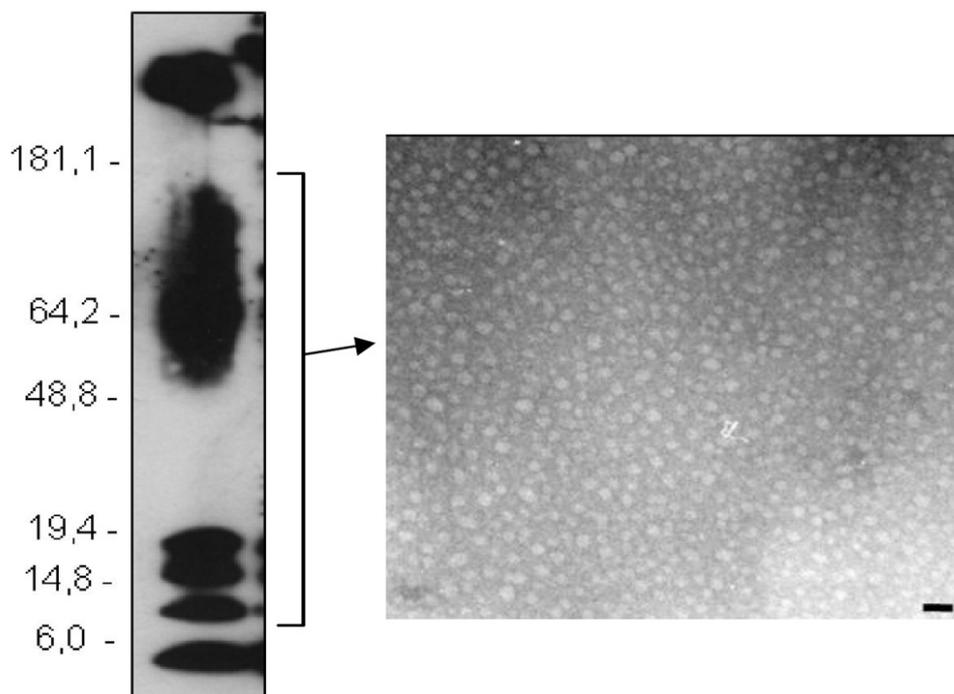


Figura 7: Western blot representativo das preparações de Oligômeros de A β . O tamanho dos agregados varia de dímeros até oligômeros de ~50-100 kDa. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (aumento de 85.000x) obtida pela Dra. Andréa Paula-Lima.

III.2) Culturas primárias de hipocampo rato

Embriões de rato Sprague-Dawley foram obtidos de ratas com 18 dias de gestação para preparo de culturas de hipocampo. Após decapitação dos embriões, os encéfalos foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução estéril de PBS glicose 2% a 37°C. Com o auxílio de lupa, os hipocampos foram dissecados, as meninges foram retiradas e o tecido foi fracionado com tesoura cirúrgica estéril. As células foram dissociadas mecanicamente com pipetas Pasteur de pontas flambadas, e centrifugadas a 1000 X g por 4 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do sobrenadante, as

células foram ressuspensas em meio Neurobasal suplementado com 2% de suplemento B27 (Gibco, Grand Island, NY), 0.5 mM de glutamina (Gibco), 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 10 µg/mL de fungizona (Cristália, Itapira, SP). Após quantificação em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas com densidade de 1.500 células/mm² (placas de 6 e 96 poços, 100 e 400 µL por poço respectivamente) e 1.000 células/mm² (placas de 6 poços, 1,5 mL por poço) . As placas foram previamente tratadas com solução de poli-L-lisina a 10 µg/mL. As culturas foram mantidas a 37°C, em estufa umidificada contendo 5% CO₂/95% ar atmosférico, por períodos de 18-21 dias *in vitro* (DIV). Um terço do volume de meio em cada poço foi trocado por meio Neurobasal suplementado fresco a cada 7 DIV.

III.3) Imunocitoquímica

Após 18-19 DIV, foi avaliado o nível de imunodeteção de IRS-1 fosforilado em resíduos de serina 636 ou tirosina 465, além da imunodeteção de ligação dos oligômeros em culturas de hipocampo expostas ou não aos oligômeros de A β (500 nM) durante 3 horas. As células foram fixadas pela adição de paraformaldeído 4% a igual volume de meio de cultura por 5 minutos, seguido de incubação apenas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos. As células foram, então, bloqueadas por 2 horas em solução contendo 10 % de NGS (Gibco, Grand Island, NY) em PBS, em câmara úmida, temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas a 4 °C por 12 horas na presença do anticorpo primário monoclonal anti-oligômeros de A β 1µg/mL (NU4) (Lambert e cols., 2007) gentilmente cedido pelo Prof. William Klein (Northwestern University). Após a lavagem com abundante volume de PBS, as células foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-IRS-

1 pserina 636 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (1:200 por duas horas temperatura ambiente em solução contendo 10 % de NGS, 0,1 % de Triton X-100 (Merck, Darmstadt, DE) em PBS, em câmara úmida. Após a incubação com os anticorpos primários, as células foram extensamente lavadas com PBS. Anticorpos secundários anti-IgG murino conjugado a Alexa 555 (Molecular Probes, Carlsbad, CA) e anti-IgG de coelho conjugado a a Alexa 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA) foram diluídos em solução de bloqueio a 1:2.000 e adicionados às células. Após 2 horas de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS. As lamínulas com as células foram montadas em lâminas na presença de Prolong® e examinadas ao microscópio de fluorescência invertido TE300 Nikon Eclipse. Foram obtidas imagens de vinte a trinta campos, aleatoriamente escolhidos, em cada uma das 3 lamínulas para cada condição experimental.

III.4) Análises dos dados

As intensidades de fluorescência da imunomarcação de IRS-1 e dos oligômeros foram analisadas em 3-6 experimentos usando culturas neuronais independentes. Vinte a trinta imagens foram adquiridas em cada uma das condições experimentais por experimento. Os níveis de intensidade de fluorescência do IRS-1 e da ligação dos oligômeros foram determinados pela quantificação da densidade integrada de fluorescência (DIF) das imagens através do programa ImageJ (V1.38, NIH, USA) (Gong e cols., 2003).

IV) RESULTADOS

IV.1) Artigo

Os resultados apresentados no artigo a seguir, mostram que oligômeros do peptídeo A β aumentam os níveis de fosforilação em resíduos de serina do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1). Este efeito inibidor é mediado pela proteína c-Jun N-Terminal quinase (JNK), de um modo dependente da ativação da via de sinalização do fator de necrose tumoral (TNF α). Este mecanismo inibitório é similar ao observado na resistência à insulina periférica em casos de diabetes tipo 2 e obesidade. A inibição da sinalização foi prevenida por drogas que estimulam a sinalização por insulina. Além disso, também observamos que a insulina e a Exendina-4, preveniram o bloqueio do transporte axonal induzido pelos oligômeros. Estes dados reforçam a hipótese da importância da sinalização de insulina para a manutenção dos processos biológicos fundamentais para as funções neuronais. Apresentam também implicações relevantes para a doença de Alzheimer e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas na DA.

O manuscrito em anexo, se encontra em fase final de redação, para ser submetido à publicação em breve.

Exendin-4 and infliximab protects against neuronal insulin resistance triggered by Alzheimer's toxic A β oligomers

Theresa R. Bomfim¹, Helena Decker^{1,2}, Michael Silverman³, William L. Klein⁴, Sergio T. Ferreira¹ and Fernanda G. De Felice^{1,4}

1- Instituto de Bioquímica Médica; 2- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil; 3- Canada 4-Department of Neurobiology and Physiology, Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA

Corresponding author: Fernanda G. De Felice; Instituto de Bioquímica Médica, Bloco H2-019, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil Tel. (+5521) 2562-6790; E-Mail: felice@bioqmed.ufrj.br

Abstract

Brain insulin signaling, fundamental for memory formation, is impaired in Alzheimer's disease (AD). This is thought to trigger a novel type of insulin-resistant diabetes in the brains of AD patients. To search for cellular mechanisms that instigate neuronal insulin resistance in mild cognitive impairment (MCI) and AD, we have investigated the impact of oligomers on insulin signaling. It is increasingly clear that neuron damage in AD is attributable to the pathogenic impact of soluble A β oligomers (also known as ADDLs) and recent work has strongly implicated oligomers in causing CNS neurons to become insulin resistant. Using mature hippocampal neurons in culture, we found that oligomers inhibit physiological tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) by the insulin receptor (IR) and induce IRS-1Ser636 phosphorylation, similar to what occurs in type 2 diabetes. IRS-1 was found to become phosphorylated at serine 636 at a very early stage of MCI/AD. Suggesting that similar mechanisms operate in peripheral and brain insulin resistance, oligomer-induced abnormal IRS-1 phosphorylation was blocked by the c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) inhibitor SP600125 and by infliximab, a tumor necrosis factor- α (TNF- α) blocking monoclonal antibody currently used to treat arthritis. SP600125 also blocked oligomer-induced impairment in axonal transport, a defect present in neurodegenerative diseases. Most significantly, the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog exendin-4 and insulin, drugs used for treatment of diabetes, fully blocked the deleterious impact of oligomers on IR signaling and axonal transport. Our findings identify cellular mechanisms by which A β oligomers instigate neuronal insulin resistance and suggest that exendin-4 and infliximab may be attractive new agents to defend neurons against oligomer-induced damage in AD.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a devastating form of dementia that causes progressive decline in brain function. Memory is known to be specifically affected in AD patients (1). The mechanism underlying memory loss seems to comprise the impairment of synaptic information storage caused by soluble A β oligomers, also known as ADDLs (2, 3). A β oligomers are neurotoxins that accumulate in AD brains (4) and act as pathogenic ligands, binding to specific sites at synapses (4, 5). Oligomer binding instigates pathological changes characteristic of AD, including abnormal tau hyperphosphorylation and oxidative stress (5, 6). Of particular relevance to mechanisms of memory loss, A β oligomers trigger the internalization of receptors critical to plasticity and memory (7-9), disrupt long-term potentiation (LTP) (11-13) and induce synapse deterioration (8, 10)

Brain insulin signaling, which can decline with diabetes, aging and AD (11-13), is important for many aspects of neuronal function, including plasticity and memory formation (14, 15). Compelling evidence indicates that stimulating brain insulin signaling in humans through administration of intranasal insulin leads to enhanced learning and memory (16). Intranasal administration of insulin has also been shown to improve memory performance in early AD patients (17). *In vitro*, insulin was found to protect against A β oligomer-induced inhibition of LTP (18). We have recently shown that insulin protects synapses by blocking A β oligomer binding to neurons (10). The mechanism of protection, however, does not involve simple competition between oligomers and insulin for a common binding site on the neuronal surface. Rather, the down-regulation of oligomer binding sites in neurons requires insulin receptor (IR) tyrosine kinase activity (10).

Binding of insulin to its receptor initiates a phosphorylation cascade, starting with IR autophosphorylation at tyrosine residues and subsequent activation of IR substrate-1 (IRS-1) (19). Tyrosine phosphorylation of IRS-1 by the IR allows its interaction with downstream signaling proteins that promote insulin action. On the other hand, serine phosphorylation uncouples IRS-1 from the IR, thereby inhibiting its tyrosine phosphorylation and insulin signaling (20). The dysregulation of IRS-1 signaling thus leads to peripheral insulin resistance associated with type 2 diabetes mellitus (21, 22).

The connection between AD and a new form of neuronal insulin resistance (a type of “brain diabetes”) has been recently proposed (23), raising the intriguing possibility that the molecular mechanisms leading to impaired insulin action in diabetes and in AD may share common features. In an attempt to determine why neurons become resistant to insulin in AD, we have investigated the impact of A β oligomers on IRS-1 phosphorylation using highly differentiated neuronal hippocampal cultures, a preferred model for studies of synapse cell biology (24) and mechanisms of oligomer-induced neurotoxicity (8, 10). Results show that oligomers inhibit physiological IRS-1 tyrosine phosphorylation and induce IRS-1 serine phosphorylation. Of clinical relevance, IRS-1 was found to become phosphorylated at serine 636 at a very early stage of MCI/AD. Abnormal phosphorylation of IRS-1 was blocked by the c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) inhibitor SP600125 and by infliximab, a tumor necrosis factor- α (TNF- α) blocking monoclonal antibody. SP600125 also blocked oligomer-induced impairment in axonal transport, a defect present in neurodegenerative diseases (25). Activation of JNK and TNF- α is thought to be a common cause of peripheral insulin resistance in type 2 diabetes and in obesity-related insulin resistance (26). Infliximab, currently used to treat arthritis and other inflammatory diseases, has been recently proposed as a new therapeutic approach to treat type 2 diabetes and obesity-linked insulin resistance (27).

Significantly, insulin and the insulinotropic glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog exendin-4 blocked the deleterious impact of oligomers on neuronal IR signaling. Notably, exendin-4 was also found to preserve oligomer-induced impairment in axonal transport. Exendin-4 is the first of a new class of drugs approved to treat type 2 diabetes. It is a naturally occurring and long-acting analog of GLP-1 that binds the GLP-1 receptor, thereby activating signaling pathways downstream of the insulin receptor (28) and enhances glucose-dependent insulin secretion (29). At present, there is no effective treatment for AD, leading to an intense search for innovative disease-modifying therapies. Bolstering brain insulin signaling by exendin-4 and preventing inflammation-induced insulin resistance with infliximab may constitute novel strategies to counteract mechanisms initiating memory loss in AD.

Results

IRS-1 becomes phosphorylated at serine 636 in Mild Cognitive Impairment (MCI) and AD patients. The brain becomes insulin resistant in AD, a phenomenon that has been referred to as type 3 diabetes. In the periphery, insulin resistance has been linked to serine phosphorylation of IRS-1 (23, 24). Our initial results demonstrate that in human brain tissue, IRS-1 becomes phosphorylated at serine 636 (IRS-1pSer636) at a very early stage of MCI and AD (Fig. 1). These findings are in harmony with peripheral mechanisms that lead to type 2 diabetes and support the hypothesis that MCI/AD are characterized by CNS insulin resistance.

A β oligomers induced serine phosphorylation of IRS-1. It is increasingly clear that neuron damage in AD is attributable to the pathogenic impact of soluble A β oligomers (also referred to as ADDLs) (3). Recent work has strongly implicated oligomers in causing CNS neurons to become insulin resistant (10, 13, 23). Thus, we have tested the hypothesis that IRS-1pS636 in MCI/AD brain could develop from the impact of A β oligomers. We used highly differentiated hippocampal cell cultures, a model widely used for studies of synaptic cell biology and that has been instrumental in developing an understanding of oligomer-induced synaptotoxicity. A β oligomers induce a significant, abnormal elevation of IRS-1pS636 in neuronal cultures. Results provide a salient pathogenic basis to account for elevated IRS-1pS in MCI/AD brain. (Fig. 2, Panels A and B). Consistent with expected insulin resistance associated with IRS-1pS, oligomers inhibit insulin-stimulate tyrosine phosphorylation of IRS-1 (Fig. 2, Panels D and E), an essential step in the signaling pathway stimulated by the insulin receptor.

c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) and Tumor necrosis factor- α (TNF- α) mediate oligomer-induced impairment of IRS-1 signaling. The above findings in neurons exposed to oligomers are similar to what happens in peripheral insulin resistance in type 2 diabetes. The mechanisms in peripheral insulin resistance in type 2 diabetes and obesity are thought to involve activation of JNK (26). Testing JNK involvement in the oligomer-induced CNS

insulin resistance, we found that oligomer-induced abnormal IRS-1pS was blocked by the JNK inhibitor SP600125 (Fig 3, panel C).

It has been suggested that JNK activity is stimulated upstream through the action of the pro-inflammatory cytokine TNF α (30). Infliximab, a TNF α neutralizing antibody, is a resource capable of selectively neutralizing TNF α and that has been developed for use in treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. Remarkably, infliximab completely blocked the abnormal serine phosphorylation of IRS-1 triggered by oligomers (Fig 3, panel D). Infliximab has been recently proposed as a new therapeutic approach to treat type 2 diabetes and obesity-linked insulin resistance (27). These results thus suggest that TNF- α modulation may represent a novel therapeutic approach in AD.

Oligomers induce impairment in axonal transport of dense core vesicles (DCVs) via JNK activation. So far, our results suggest that activation of pro-inflammatory TNF α triggers JNK-mediated IRS-1pSer. Activation of JNK has been shown to impair axonal transport in neurodegenerative diseases (25). In fact, several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, display axonal pathologies comprising abnormal accumulations of proteins and organelles that reveal damage to transport through axons (25). We have recently found that A β oligomers impair axonal transport in hippocampal neurons (Decker, Ferreira, Silverman, unpublished results). We next tested the critical hypothesis that the pathway from oligomers leading to JNK activation is responsible for defects in axonal transport. Remarkably, the transport defect induced by A β oligomers was prevented by SP600125, a JNK inhibitor (Fig. 4, Supp. Fig. 1 and Table 1). Results thus suggest that stimulation of insulin signaling plays important roles in preserving axonal transport in neurons exposed to A β oligomers.

Insulin and the GLP-1 analog exendin-4 block both oligomer-induced impairment on IRS-1 and the impairment in axonal transport. Enhancement of insulin signaling is a therapeutic approach used to treat type 2 diabetes. Previous work has indicated that this enhancement would protect synapses against oligomers (10). Importantly, protection by insulin was found to require insulin receptor activity (14). We next tested whether this protection extends to the IRS-1pS/JNK pathway we have linked to A β oligomers. Agents tested were

insulin and a newer therapeutic drug for diabetes called Exendin-4. Exendin-4 is a naturally occurring and long-acting analog of GLP-1 that binds the GLP-1 receptor and activates signaling pathways downstream of the insulin receptor (28). Significantly, we found that 1 μ M insulin and 300 nM exendin-4 prevented both the oligomer-induced increase in IRS-1pSer636 levels (Fig. 5, panel B and C) and the decrease in IRS-1pTyr465 levels (Sup. Fig. 4). Demonstrating the specificity of the effect of exendin-4, exendin 9-39, a potent GLP-1 receptor antagonist and a competitive inhibitor of exendin-4, completely abrogated the protective action of exendin-4 (Fig 5, panel D). As would be predicted, insulin and Exendin-4 also prevent the impaired axonal transport caused by oligomers (Fig 4, panel F, Sup. Fig 1, Supp Fig. 2, Supp. Fig. 3, Table 1 and Table 2).

We recently showed that insulin prevents oligomer binding to neurons and protects against oligomer-induced synapse loss and oxidative stress (10). We next tested whether exendin-4 might also interfere with oligomer-binding. Exendin-4 did not prevent the attack to neurons by oligomers (Sup. Fig. 5), indicating that GLP1-receptor activation prevent oligomer-induced impairment in IRS-1 signaling even when oligomers are attached to neurons. These results establish that GLP1-receptor activation by exendin-4 may be an important strategy to prevent oligomer-induced impairment in IRS-1 signaling.

Discussion

Results reported here identify cellular mechanisms that instigate neuronal insulin resistance in MCI and AD. We found that IRS-1 becomes phosphorylated at Ser636 at a very early stage of MCI/AD. A β oligomers, soluble synaptotoxins underlying Alzheimer's memory loss, induce an abnormal elevation of IRS-1pSer 636, granting a relevant pathogenic basis to explain elevated IRS-1pSer levels in MCI/AD brain. Abnormal serine phosphorylation of IRS-1 triggered by oligomers was prevented by the c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) inhibitor SP600125 and by infliximab, a tumor necrosis factor- α (TNF- α) blocking monoclonal antibody. These results indicate that, similar to what takes place in peripheral insulin resistance in type 2 diabetes, neuronal insulin resistance in AD derives from an A β oligomer-induced inflammatory response mediated by TNF- α and JNK activation. Interestingly, we found that serine phosphorylation of IRS-1 induced by oligomers was blocked by both exendin-4, a GLP-1 analog, and insulin. Insulin signaling was further found to play an important role in preserving axonal transport in neurons exposed to A β oligomers. Results provide a molecular basis for the emerging concept that impaired brain insulin signaling in AD can manifest as a novel type of insulin-resistant diabetes (23), illuminating novel approaches to AD therapeutics.

The neuronal insulin receptor (IR) is an element of synapses fundamental to learning and memory and abundantly present in the cortex and hippocampus (15). Recent studies showed that brain levels of insulin and IRs are lower in AD brains (17). We have shown that A β oligomers induce a massive removal of IRs from the membranes of neuronal processes (9, 10), a finding that has been confirmed in neuropathology studies showing that IRs are lost from dendrites in AD brain (31). In cultured neurons, insulin treatment prevents the attack of A β oligomers to neurons, blocks oligomer-induced spine degeneration, oxidative stress and IR loss (14). Insulin also protects against accumulation of hyperphosphorylated tau (32), a pathological hallmark of AD that is induced by oligomers (6). Thus, stimulation of brain insulin signaling appears as a promising approach to prevent synapse damage and memory loss in AD.

Importantly, the anti-TNF- α antibody, infliximab, was found here to block the abnormal serine phosphorylation of IRS-1 triggered by A β oligomers. This finding is in

harmony with a very recent study that showed that infliximab prevents oligomer-induced inhibition of LTP (33). Given the important role of insulin signaling in memory formation (37), our current results provide a plausible mechanism to explain the beneficial action of infliximab in LTP.

Neurodegenerative processes in AD are thought to be triggered by a chronic inflammatory response to A β (34, 35). TNF- α is a pro-inflammatory cytokine released by microglial cells (36). Once released in the brain, TNF- α can activate surrounding microglial cells, leading to more TNF- α production and exacerbated inflammatory response. Among other responses, TNF- α binding to its plasma membrane receptor activates JNK, which phosphorylates IRS-1 at serine residues, uncoupling it from the IR and blocking downstream insulin signaling. In support of our results, (37) recently showed that A β oligomers induce tau hyperphosphorylation and inactivation of IRS-1 via JNK activation. Activation of TNF- α and JNK is thought to be a common cause of peripheral insulin resistance in type 2 diabetes (30). Infliximab is currently used to treat arthritis and other peripheral inflammatory diseases and has been recently suggested as a new therapeutics to target insulin resistance in type 2 diabetes (33). Indeed, glucose homeostasis was found to be restored in diabetic mice treated with infliximab (33). Interestingly, our current results suggest that TNF- α modulation may constitute a novel and efficient mechanism to defend neurons against A β oligomer-induced blockade of insulin signaling and synapse deterioration.

We found striking beneficial effects of the GLP-1 analog, exendin-4, against oligomer-induced impairment in neuronal IRS-1 signaling and axonal transport of organelles. GLP-1 receptor stimulation is considered a novel pharmacological approach for diabetes, as it activates signaling pathways downstream of the IR (29). GLP-1 is an endogenous 30-amino acid peptide (38). In the pancreas, GLP-1 receptor stimulation activates adenylyl cyclase and generates cAMP, leading to activation of the protein kinase A and Epac pathways (39). GLP-1 receptor is present and functional in cultured neurons as well as in rodent and human brains and emerging evidence indicates that its stimulation of neuronal GLP-1 receptors regulates neuronal plasticity and cell survival (40, 41). Exendin-4, the first of a new class of drugs approved to treat type 2 diabetes, is a naturally occurring and long-acting analog of GLP-1. Exendin-4 promptly crosses the blood-brain barrier (42)

and has been shown to be neuroprotective in cellular (45, 46) and rodent models of stroke, Huntington and Parkinson's disease (43, 44).

AD is a devastating disease of memory for which there is no cure or effective treatment. Soluble A β oligomers, potent neurotoxins that accumulate in the brains of AD patients (4), appear to comprise a prime new target for therapeutics. Oligomers attack synapses and this attack possibly constitutes a primary event leading to synaptotoxicity and memory impairment in AD (8, 45). In support of this view, drugs and antibodies designed to target A β oligomers have provided positive results in AD clinical trials (46). However, questions about the efficacy and safety of these approaches have still not been fully addressed. Our findings that exendin-4 and infliximab, drugs that are approved for treatment of type 2 diabetes and inflammatory diseases, respectively, block the deleterious impact of A β oligomers on neuronal IR signaling and axonal transport may thus be of direct relevance to the development of novel therapeutic approaches in AD.

Materials and Methods

Materials. Synthetic A β_{1-42} peptide was from American Peptides (Sunnyvale, CA). Scrambled A β_{1-42} was from Anaspec (San Jose, CA). Bovine and human insulin, 1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol (HFIP), DMSO, poly-L-lysine were from Sigma (St. Louis, MO). Culture media/reagents, Alexa-labeled secondary antibodies and ProLong anti-fade reagent were from Invitrogen (Carlsbad, CA). Electrophoresis buffers were from BioRad (Hercules, California). SuperSignal chemiluminescence reagents and the BCA protein assay kit were from Pierce (Deerfield, Illinois). Antibodies against total, Tyr465-phosphorylated or Ser636-phosphorylated insulin receptor substrate 1 (IRS1) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Exendin 4 and exendin 9-39 were from Bachem (Torrance, CA). SP600125 was from Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Plasmid p β -actin-BDNF-mRFP was received from G. Banker (OHSU, Oregon, USA). Mitochondrially-targeted YFP was received from G. Rintoul (SFU, BC, Canada).

A β oligomers and scrambled A β_{1-42} Preparation. Oligomers were prepared from A β_{1-42} as previously described (2, 7). Briefly, the peptide was dissolved in HFIP to 1 mM and stored as a dried film at -20 °C after solvent evaporation. The film was resuspended in DMSO to a final concentration of 5 mM, thoroughly vortexed and sonicated for 10 min. The solution was then diluted with ice-cold PBS to 100 μ M and left at 4 °C overnight. The solution was centrifuged at 14,000 g for 10 min and the supernatant was collected. Solutions of the scrambled peptide were prepared and treated under conditions identical to those used to obtain oligomers.

Mature hippocampal cultures. Primary hippocampal neuronal cultures were prepared according to established procedures (5, 6) and were used after 18-21 DIV. Cultures were treated at 37 °C for 3 h with 500 nM A β oligomers or an equivalent volume of the corresponding DMSO/PBS vehicle. When present, insulin (1 μ M), exendin 4 (300 nM), SP600125 (10 μ M) or infliximab (1 μ g/mL), were added to the cultures 30 min before A β oligomers. Exendin 9-39 (1 μ M) was added to cultures 15 min before exendin 4.

Immunocytochemistry. Cells were fixed and blocked as previously described (6, 10), incubated with both oligomer-selective NU4 mouse monoclonal antibody (47) (1 μ g/mL) and IRS1 (pSer636 or pTyr465, as described in “Results”) rabbit polyclonal antibody (1:200) overnight at 4 °C and then incubated for 1 h at 23 °C with Alexa-conjugated secondary antibodies. Coverslips were mounted with Prolong and imaged on a Nikon Eclipse TE 2000-U microscope.

Plasmids and expression of transgenes. p β -actin-BDNF-mRFP was received from G. Banker (OHSU, Oregon, USA). Mitochondrially-targeted YFP was received from G. Rintoul (SFU, BC, Canada). Constructs were transfected into neurons at 9 -12 days *in vitro* (DIV) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells-expressed constructs for 24 h prior to imaging.

Imaging. Cells were imaged live using a wide-field fluorescent microscope (DMI 6000 B, Leica, Wetzlar, Germany) as described (48). Axons and dendrites were initially distinguished based on morphology and confirmed retrospectively by antibody staining against MAP-2, a dendritic cytoskeletal protein.

Movies and quantitative analyses. Videos were processed using MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA) as described (48). Quantitative analysis was performed using MetaMorph. All values were compiled for analysis SPSS and significance difference between treatments was analyzed by t-test with equal or unequal variances at 95% confidence interval.

Data Analysis. IRS-1(pSer636 or pTyr465) and A β oligomer binding immunofluorescence intensities were analyzed in 3–6 experiments (see figure legends) using independent neuronal cultures. Twenty to 30 images were acquired in each experimental condition per experiment. Histogram analysis of fluorescence intensities at each pixel across the images was performed using NIH Image J (3) as described (4). Cell bodies were digitally removed from the images so that only A β oligomer or IRS-1 immunostaining on dendritic processes

was quantified. Statistical significances were assessed by ANOVA followed by post-hoc Bonferroni test.

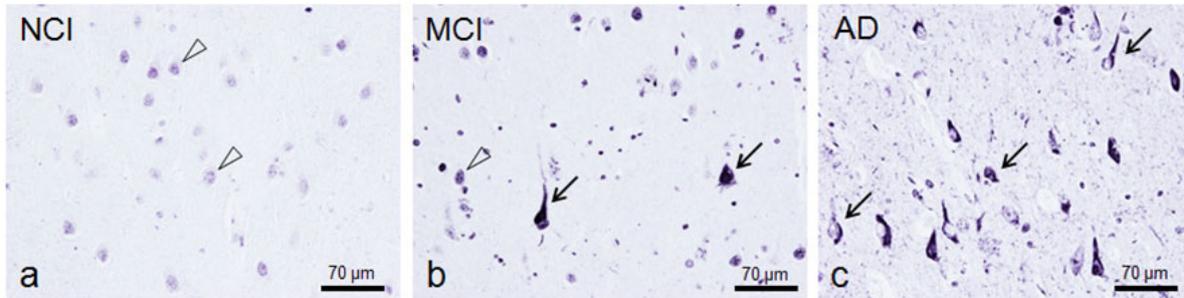


Fig. 1: IRS-1 becomes phosphorylated at serine 636 in mild cognitive impairment (MCI) and AD. Progressive increase in density of neurons (arrowed) with extra-nuclear IRS-1 pS636 in CA1 from non-cognitive impairment (NCI) to MCI to AD cases. In NCI cases, virtually all the detectable IRS-1 pS is found in nuclei (hollow arrow heads).

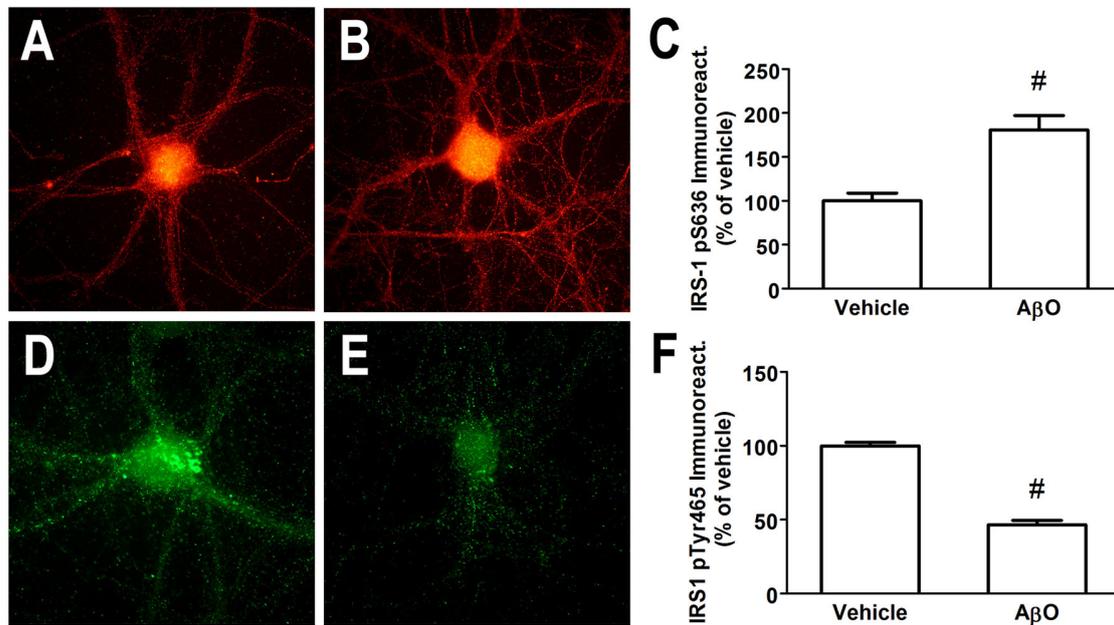


Fig. 2: A β oligomer induces abnormal phosphorylation of IRS-1. Cultured hippocampal neurons were exposed to 500 nM A β oligomers at 37 °C for 3 h followed by immunolabeling with anti-pSer636 IRS-1 (A-C) or anti-pTyr465 IRS-1 (D-F). Representative immunofluorescence images are shown for hippocampal neurons treated with vehicle (A and D), 500 nM A β oligomers (B and E). Panels C and F show integrated pSer636 IRS-1 and pTyr465 IRS-1 immunofluorescence, respectively, from 4 experiments using independent cultures (30 images analyzed per experimental condition per culture). # indicates a statistically significant ($p < 0.001$) difference relative to vehicle-treated cultures.

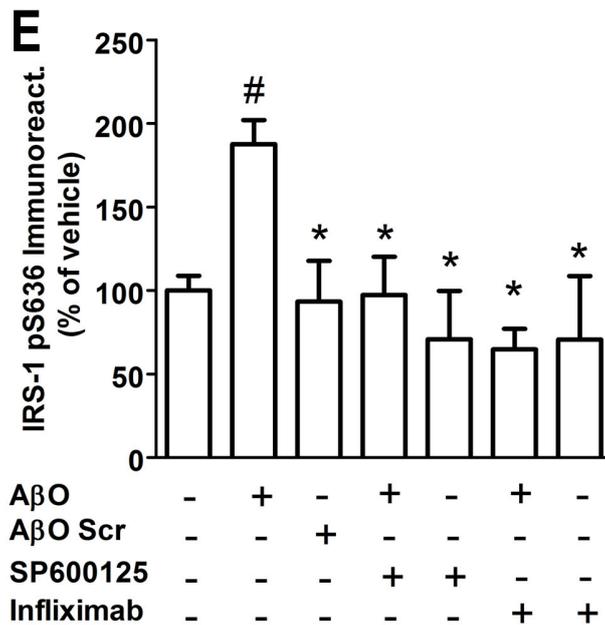
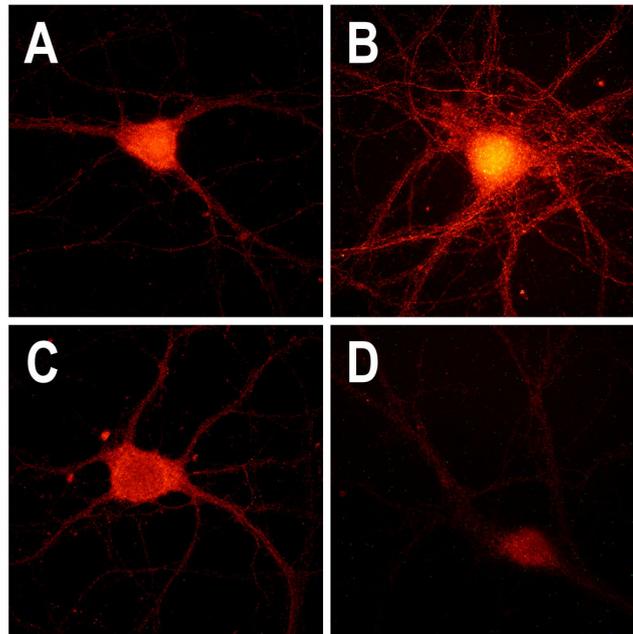


Fig. 3: c-Jun N-terminal kinase (JNK) and Tumor necrosis factor- α (TNF α) mediate oligomer-induced impairment of IRS-1 signaling. Neurons in culture were pre-treated for 30 min with 10 μ M SP600125, a JNK inhibitor, or 1 μ g/mL infliximab, a neutralizing

TNF α antibody, followed by 500 nM A β oligomers for 3 h. Representative images are shown for mature hippocampal cultures treated with vehicle (A), 500 nM oligomers (B), 10 μ M SP600125 + oligomers (C), 1 μ g/mL infliximab + oligomers (D). (E) Integrated pSer636 IRS-1 immunofluorescence levels from 4 experiments using independent neuronal cultures (20 images analyzed per experimental condition per culture). # indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to vehicle-treated cultures. * indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to cultures treated with A β oligomers.

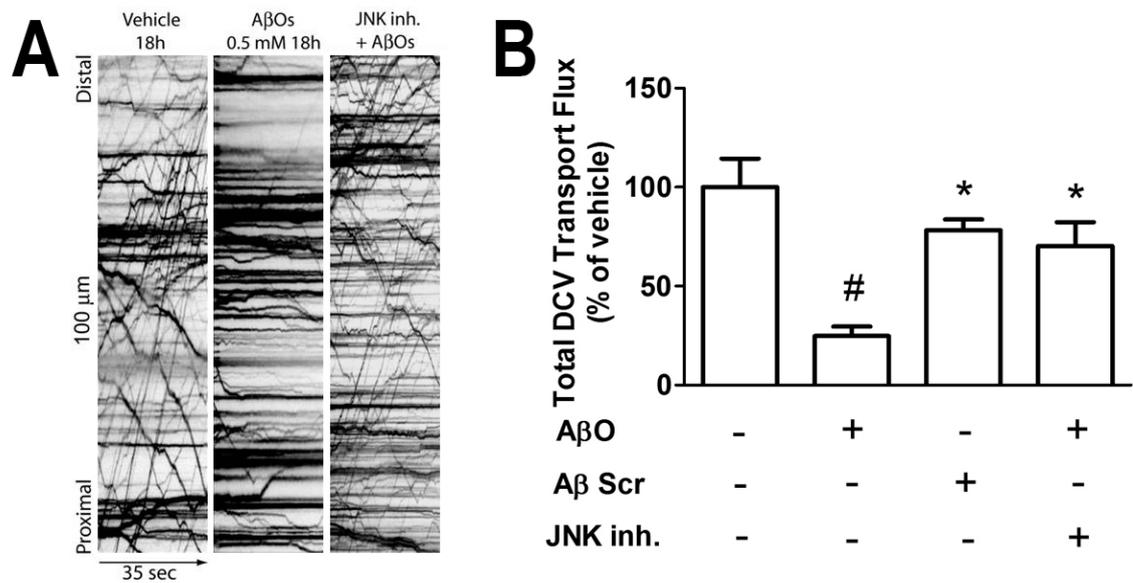


Fig. 4: A β oligomers induce impairment in axonal transport of dense core vesicles (DCVs) via JNK activation. **A**, Representative kymographs comparing axonal DCV transport in control (vehicle), A β oligomers-treated neurons (18 h, 500 nM A β O) and cells pre-treated for 30 min with 10 μ M SP600125, followed exposure to 500 nM oligomers. Disruption of DCV transport was totally prevented by the JNK inhibitor SP600125. **B**, Quantification of total transport DCV. A minimum of 15 cells per condition from at least 2 different cultures were analyzed. # indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to vehicle-treated cultures. * indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to cultures treated with A β oligomers.

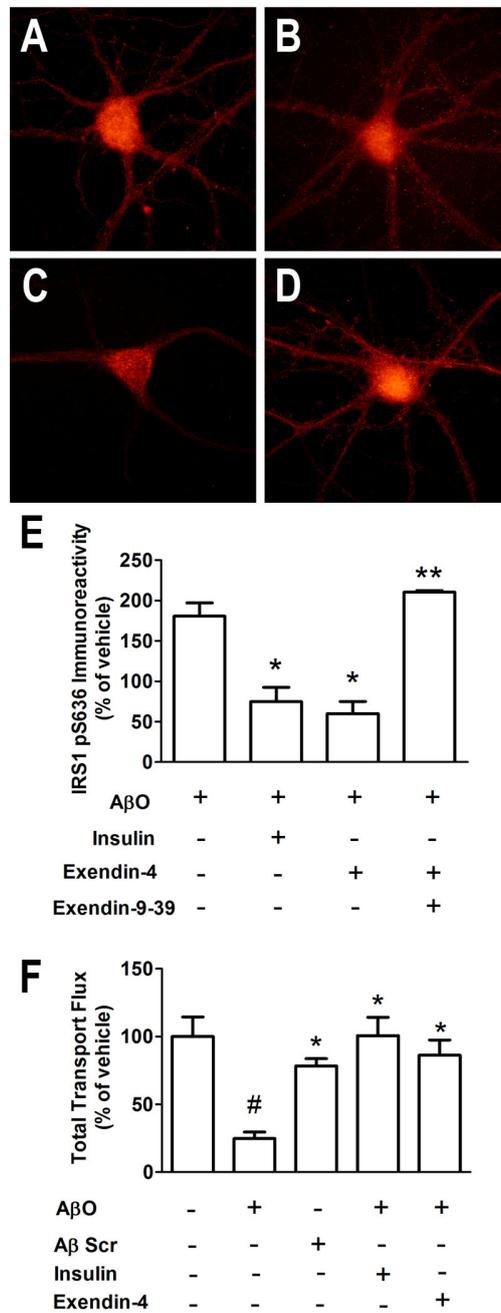
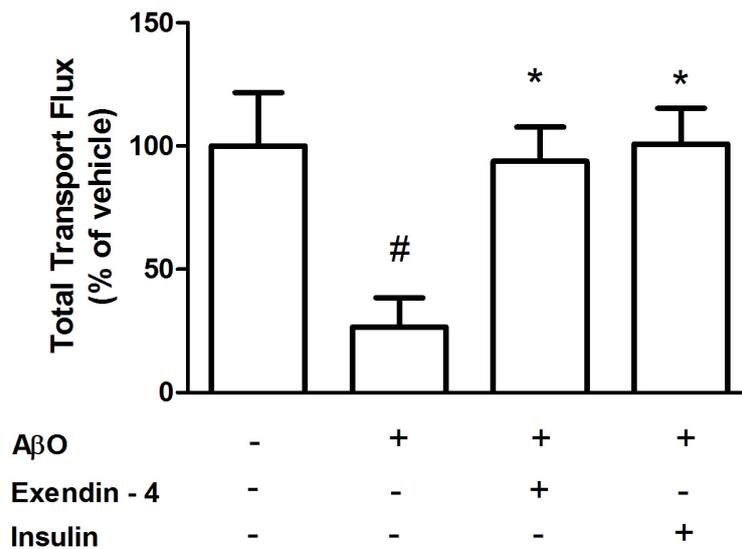


Fig. 5: Insulin and Exendin-4 prevents A β oligomer-induced serine phosphorylation of IRS-1 and the impairment in axonal transport. (A–D) Representative pSer636 IRS-1 immunofluorescence images from hippocampal neurons exposed to 500 nM oligomers for 3h (A), 1 μ insulin + 500 nM oligomers (B), 300 nM exendin-4 + 500 nM oligomers (C), or 1 μ M exendin 9-39 + 300 nM exendin-4 + 500 nM oligomers (D). When present, insulin

and exendin were added 30 min prior to oligomer exposure. (E) Integrated pSer636 IRS-1 immunofluorescence levels from 4 experiments using independent cultures (20 images analyzed per experimental condition per culture). # indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to vehicle-treated cultures. * indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to cultures treated with A β oligomers, and ** indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to cultures treated with exendin-4 + A β oligomers. (F) Quantification of total transport DCV of neurons exposed to A β oligomers (18 h, 500 nM A β O), and cells pre-treated for 30 min with 1 μ insulin and 300nM exendin-4, followed by exposure to oligomers. Disruption of DCV transport was totally prevented by insulin and exendin-4. A minimum of 15 cells per condition from at least 2 different cultures were analyzed. # indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to vehicle-treated cultures. * indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to cultures exposed to A β oligomers.

Supplemental Figure 1: Live imaging showing dense-core vesicle (DCV) transport in control (vehicle) cultures, neurons, exposed to oligomers (18h, 500nM) or neurons pre-treated for 30 min with 300nM exendin-4, followed by oligomer exposure. Exendin-4 treatment totally prevented disruption of DCVs transport induced by oligomers. (Esta figura encontra-se no CD em anexo)

Supplemental Figure 2: Time-lapse imaging of mitochondria transport in control, oligomer-exposed (18h, 500nM) neurons or cells pre-treated for 30 min with 300nM exendin-4, followed by oligomer exposure. Exendin-4 completely block oligomer-induced disruption of mitochondria transport. (Esta figura encontra-se no CD em anexo)



Supplemental Figure 3: Exendin-4 and insulin prevent Aβ oligomer-induced inhibition of mitochondria transport in hippocampal neurons. Quantification of total mitochondrial transport in control (vehicle), oligomer-exposed neurons (18 h, 500nM) or neurons pre-treated for 30 min with 1 μM insulin or 300nM exendin-4, followed by oligomer exposure. Inhibition of mitochondria transport induced by oligomers was totally prevented by exendin-4 and insulin. A minimum of 15 cells per condition from at least 2 different cultures were analyzed. # indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to vehicle-treated cultures. * indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to cultures exposed to Aβ oligomers.

Supplemental table 1: Quantification of transport of DCVs

	DCVs				
	Traffic values			%	
	All events	Anterograde	Retrograde	All events	
Flux (min⁻¹)					
Vehicle 18h	10.28 ± 1.49	6.60 ± 1.18	3.67 ± 0.55 #	100.00 ± 14.09	
AβOs 18h	2.55 ± 0.49	1.40 ± 0.29 **	1.15 ± 0.23 **	24.78 ± 4.75 **	
AβOs scrambled	8.05 ± 0.55	4.42 ± 0.41 ++	3.63 ± 0.44 ++	78.29 ± 5.35 ++	
Insulin + AβOs	10.35 ± 1.39	6.13 ± 0.85 ++	4.26 ± 0.81 ++	100.64 ± 13.55 ++	
Exendin + AβOs	8.68 ± 1.29	4.35 ± 0.59 ++	4.34 ± 0.85 ++	84.43 ± 12.63 ++	
JNK inhibitor + AβOs	7.23 ± 1.23	3.40 ± 0.80 */+	3.83 ± 0.54 ++	70.35 ± 12.01 ++	
Velocity (μm/s)					
Vehicle 18h	1.66 ± 0.11	1.66 ± 0.10	1.63 ± 0.12	100.00 ± 6.68	
AβOs 18h	1.32 ± 0.07	1.32 ± 0.08 *	1.34 ± 0.07	79.94 ± 4.15 *	
AβOs scrambled	1.68 ± 0.09	1.74 ± 0.07 +	1.59 ± 0.14	101.51 ± 5.72 +	
Insulin + AβOs	1.75 ± 0.09	1.82 ± 0.09 ++	1.63 ± 0.09 +	105.44 ± 5.19 +	
Exendin + AβOs	1.39 ± 0.10	1.37 ± 0.10	1.40 ± 0.11	83.81 ± 6.19	
JNK inhibitor + AβOs	1.96 ± 0.08	1.94 ± 0.09	1.95 ± 0.08 *	118.61 ± 4.73 *	
Run length (μm)					
Vehicle 18h	8.45 ± 0.69	9.53 ± 0.83	6.78 ± 0.51	100.00 ± 8.19	
AβOs 18h	5.20 ± 0.33	5.30 ± 0.42 **	4.90 ± 0.39 *	61.56 ± 3.85 **	
AβOs scrambled	6.03 ± 0.45	6.52 ± 0.56 *	5.39 ± 0.46	71.32 ± 5.31 *	
Insulin + AβOs	7.72 ± 0.61	8.53 ± 0.76 ++	6.70 ± 0.56 +	91.37 ± 7.23 ++	
Exendin + AβOs	7.71 ± 0.76	8.02 ± 0.73 +	7.26 ± 0.94 +	91.19 ± 8.98 +	
JNK inhibitor + AβOs	5.13 ± 0.31	5.00 ± 0.42 **	5.06 ± 0.30 *	60.74 ± 3.71 **	

Vehicle n=21 kymographs (21 cells, 3669 vesicles) / AβOs n=25 kymographs (25 cells, 1332 vesicles)

AβOscr. n=10 kymographs (10 cells, 1917 vesicles) / Insulin + AβOs n=14 kymographs (14 cells, 3273 vesicles)

Exendin + AβOs n=15 kymographs (15 cells, 2280 vesicles) / JNK inhibitor + AβOs n=15 kymographs (15 cells, 2336 vesicles)

* p<0.05 when compared with vehicle (from each column)

** p<0.0001 when compared with vehicle (from each column)

+ p<0.05 when compared with AβOs (from each column)

++ p<0.0001 when compared with AβOs (from each column)

p<0.0001 when compared vehicle anterograde with vehicle retrograde

Supplemental Table 1: Hippocampal cultures expressing the dense-core vesicle (DCV) cargo, BDNF-mRFP were imaged after exposure to 500 nM Aβ oligomers (AβO) for 18h. When present, 1 μM insulin, 300nM exendin-4 or 10μM JNK inhibitor SP600125 were added 30 min prior to oligomer exposure. Transport parameters (organelle flux, velocity, run length) of DCVs were extracted from quantitative analysis of kymograph traces as described in “Materials and Methods”.

Supplemental table 2: Quantification of transport of mitochondria

	Mitochondria				
	Traffic values				%
	All events	Anterograde	Retrograde		All events
Flux (min⁻¹)					
Vehicle 18h	0.24 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.14 ± 0.03		100.00 ± 21.70
AβOs 18h	0.06 ± 0.03	0.02 ± 0.01	* 0.04 ± 0.02	*	26.56 ± 11.84 *
Insulin + AβOs	0.24 ± 0.03	0.12 ± 0.02	+ 0.12 ± 0.03		100.83 ± 14.51 ++
Exendin + AβOs	0.22 ± 0.03	0.11 ± 0.03	+ 0.11 ± 0.02	+	93.79 ± 13.94 +
Velocity (µm/s)					
Vehicle 18h	0.42 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.46 ± 0.07		100.00 ± 8.73
AβOs 18h	0.27 ± 0.07	0.10 ± 0.05	* 0.35 ± 0.10		63.32 ± 18.02
Insulin + AβOs	0.46 ± 0.05	0.39 ± 0.07	+ 0.46 ± 0.07		108.89 ± 12.91
Exendin + AβOs	0.42 ± 0.04	0.34 ± 0.04	+ 0.47 ± 0.07		100.32 ± 9.31
Run length (µm)					
Vehicle 18h	8.26 ± 1.07	5.36 ± 0.89	8.89 ± 1.50		100.00 ± 12.93
AβOs 18h	3.27 ± 0.98	1.89 ± 0.94	** 2.80 ± 0.95	*	39.60 ± 11.87 *
Insulin + AβOs	6.88 ± 0.79	6.49 ± 1.12	++ 5.83 ± 0.98	+	83.31 ± 9.51 +
Exendin + AβOs	9.06 ± 1.06	9.35 ± 2.11	+ 8.99 ± 1.90	+	109.70 ± 12.86 +

Vehicle n=15 kymographs (15 cells, 229 vesicles) / AβOs n=15 kymographs (15 cells, 56 vesicles)

Insulin + AβOs n=13 kymographs (13 cells, 275 vesicles) / Exendin + AβOs n=14 kymographs (14 cells, 257 vesicles)

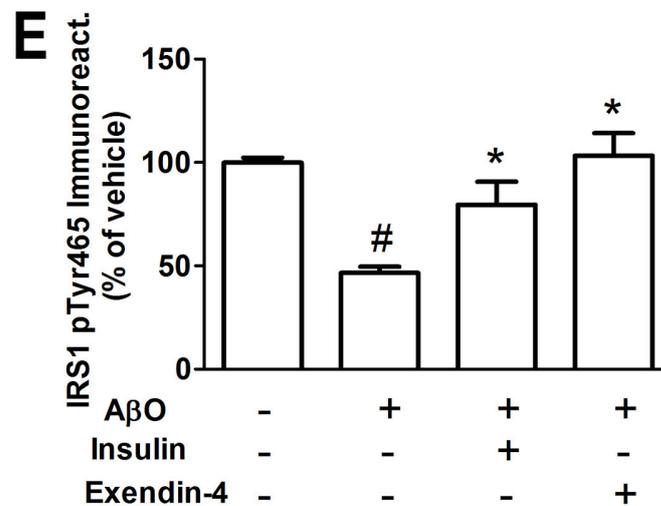
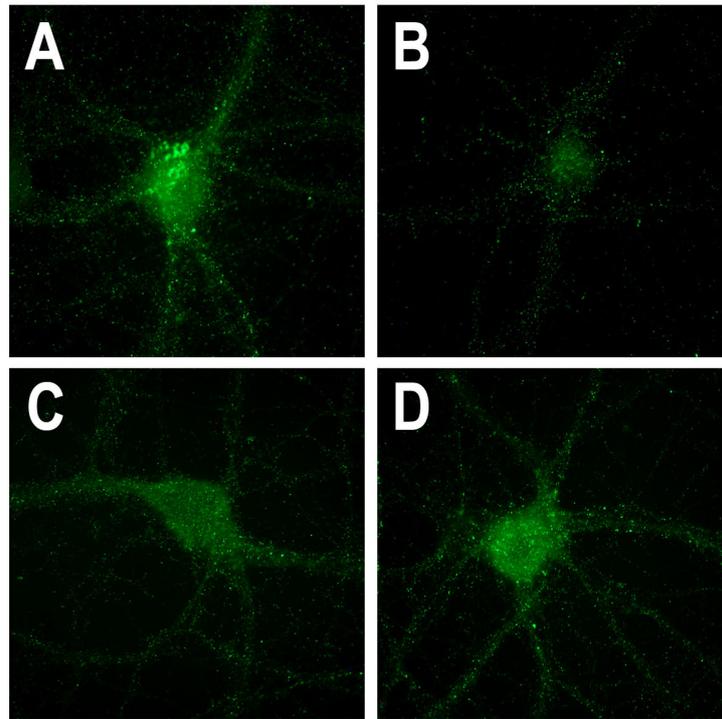
*p<0.05, when compared with vehicle (from each column)

**p<0.0001, when compared with vehicle (from each column)

+ p<0.05 when compared with AβOs (from each column)

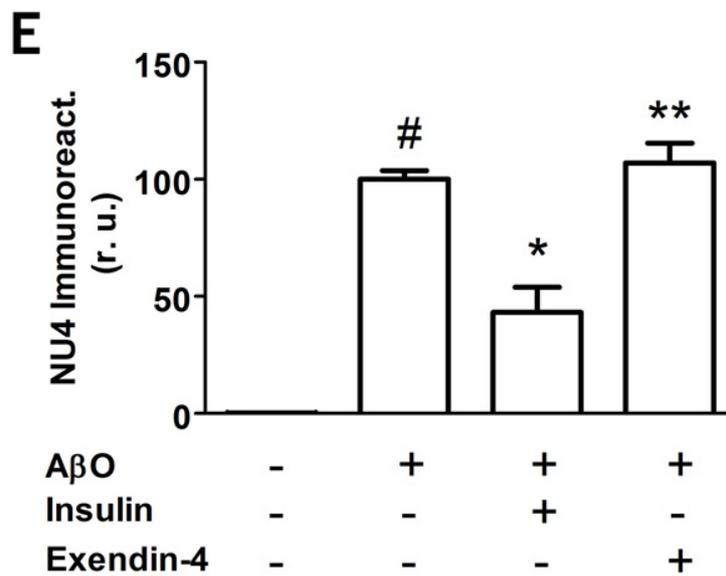
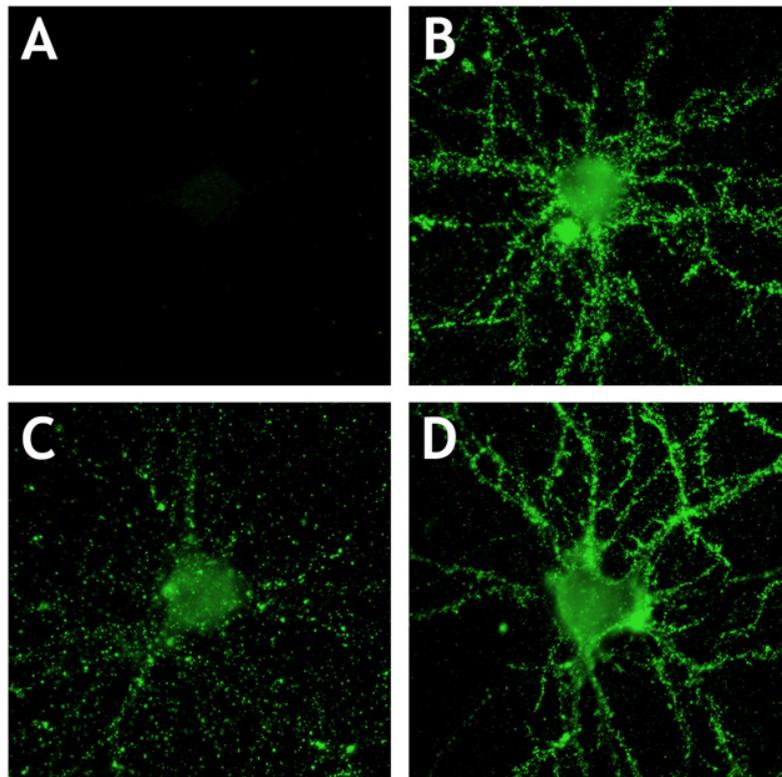
++ p<0.0001 when compared with AβOs (from each column)

Supplemental Table 2: Hippocampal cultures expressing the mitochondrially-targeted-YFP were imaged 18 hours after exposure to 500 nM Aβ oligomers (AβO) for 18h. When present, 1 µM insulin or 300nM exendin-4 were added 30 min prior to oligomer exposure. Transport parameters (organelle flux, velocity, run length) of mitochondria were extracted from quantitative analysis of kymograph traces as described in “Materials and Methods”.



Supplemental Figure 4: Exendin-4 and insulin block IRS-1 pTyr 465 inhibition induced by A β oligomers (A β O). Neurons in culture were pre-treated for 30 min with 300nM exendin-4 or 1 μ M insulin, followed by exposure to 500 nM A β O for 3 h. Graph shows integrated pTyr465 IRS-1 immunofluorescence from 4 experiments using independent neuronal cultures (20 images analyzed per experimental condition per culture). # indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to vehicle-treated cultures. *

indicates statistically significant ($p < 0.001$) differences relative to cultures exposed to oligomers.



Supplemental Figure 5: Exendin-4 does not prevent A β oligomer binding to neurons. Hippocampal neurons were pre-treated for 30 min with 1 μ M insulin(C) or 300nM exendin-4 (D), followed by exposure to 500 nM oligomers for 3 h (B). Oligomer binding was detected using the oligomer-specific NU4 antibody (1). (Panel E) Integrated oligomer

immunofluorescence from 5 experiments using independent cultures (25 images analyzed per experimental condition per culture). # indicates statistically significant difference (*, $P < 0.01$) relative to vehicle-treated neurons. * indicates statistically significant (*, $P < 0.001$) differences relative to A β O-treated and ** indicates statistically significant (*, $P < 0.001$) differences relative to insulin pre-treated neurons.

Reference List

1. Viola, K. L., Velasco, P. T., & Klein, W. L. (2008) *J. Nutr. Health Aging* **12**, 51S-57S.
2. Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 6448-6453.
3. Klein, W. L. (2006) *Alzheimers. Dement.* **2**, 43-55.
4. Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 10417-10422.
5. De Felice, F. G., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K., Fernandez, S. J., Ferreira, S. T., & Klein, W. L. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 11590-11601.
6. De Felice, F. G., Wu, D., Lambert, M. P., Fernandez, S. J., Velasco, P. T., Lacor, P. N., Bigio, E. H., Jerecic, J., Acton, P. J., Shughrue, P. J. *et al.* (2008) *Neurobiol. Aging* **29**, 1334-1347.
7. Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K. *et al.* (2005) *Nat. Neurosci.* **8**, 1051-1058.
8. Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 796-807.
9. Zhao, W. Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (2008) *FASEB J.* **22**, 246-260.
10. De Felice, F. G., Vieira, M. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K. L., Zhao, W. Q., Ferreira, S. T., & Klein, W. L. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 1971-1976.
11. Watson, G. S. & Craft, S. (2006) *J. Neurol. Sci.* **245**, 21-33.
12. Laron, Z. (2009) *Arch. Physiol Biochem.* **115**, 112-116.
13. Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005) *J. Alzheimers. Dis.* **7**, 63-80.
14. Zhao, W. Q. & Alkon, D. L. (2001) *Mol. Cell Endocrinol.* **177**, 125-134.
15. Zhao, W. Q., Chen, H., Quon, M. J., & Alkon, D. L. (2004) *Eur. J. Pharmacol.* **490**, 71-81.

16. Hallschmid, M., Benedict, C., Born, J., & Kern, W. (2007) *Expert. Opin. Drug Deliv.* **4**, 319-322.
17. Dhamoon, M. S., Noble, J. M., & Craft, S. (2009) *Neurology* **72**, 292-293.
18. Townsend, M., Mehta, T., & Selkoe, D. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 33305-33312.
19. White, M. F. (1997) *Diabetologia* **40 Suppl 2**, S2-17.
20. White, M. F. (2006) *Can. J. Physiol Pharmacol.* **84**, 725-737.
21. White, M. F. (2002) *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **283**, E413-E422.
22. Boura-Halfon, S. & Zick, Y. (2009) *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **296**, E581-E591.
23. de la Monte, S. M. & Wands, J. R. (2008) *J. Diabetes Sci. Technol.* **2**, 1101-1113.
24. Boyer, C., Schikorski, T., & Stevens, C. F. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 5294-5300.
25. De Vos, K. J., Grierson, A. J., Ackerley, S., & Miller, C. C. (2008) *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 151-173.
26. Tesz, G. J., Guilherme, A., Guntur, K. V., Hubbard, A. C., Tang, X., Chawla, A., & Czech, M. P. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 19302-19312.
27. Araujo, E. P., De Souza, C. T., Ueno, M., Cintra, D. E., Bertolo, M. B., Carnevalheira, J. B., Saad, M. J., & Velloso, L. A. (2007) *Endocrinology* **148**, 5991-5997.
28. Taguchi, A. & White, M. F. (2008) *Annu. Rev. Physiol* **70**, 191-212.
29. Perry, T. & Greig, N. H. (2003) *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 377-383.
30. Chen, G. & Goeddel, D. V. (2002) *Science* **296**, 1634-1635.
31. Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., & O'Neill, C. (2010) *Neurobiol. Aging* **31**, 224-243.
32. Spillantini, M. G. & Goedert, M. (1998) *Trends Neurosci.* **21**, 428-433.
33. Hu, N. W., Klyubin, I., Anwyl, R., & Rowan, M. J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 20504-20509.
34. Mattson, M. P., Barger, S. W., Furukawa, K., Bruce, A. J., Wyss-Coray, T., Mark, R. J., & Mucke, L. (1997) *Brain Res. Brain Res. Rev.* **23**, 47-61.
35. Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., Ruano, D., Vizuete, M., Gutierrez, A., & Vitorica, J. (2008) *J. Neurosci.* **28**, 11650-11661.

36. Streit, W. J., Conde, J. R., Fendrick, S. E., Flanary, B. E., & Mariani, C. L. (2005) *Neurol. Res.* **27**, 685-691.
37. Ma, Q. L., Yang, F., Rosario, E. R., Ubeda, O. J., Beech, W., Gant, D. J., Chen, P. P., Hudspeth, B., Chen, C., Zhao, Y. *et al.* (2009) *J. Neurosci.* **29**, 9078-9089.
38. Hui, H., Zhao, X., & Perfetti, R. (2005) *Diabetes Metab Res. Rev.* **21**, 313-331.
39. Doyle, M. E. & Egan, J. M. (2007) *Pharmacol. Ther.* **113**, 546-593.
40. Martin, B., Lopez de, M. R., Brenneman, R., Walent, T., Mattson, M. P., & Maudsley, S. (2005) *Neuromolecular. Med.* **7**, 3-36.
41. Li, Y., Duffy, K. B., Ottinger, M. A., Ray, B., Bailey, J. A., Holloway, H. W., Tweedie, D., Perry, T., Mattson, M. P., Kapogiannis, D. *et al.* (2009) *J. Alzheimers. Dis.*
42. Harkavyi, A., Abuirmeileh, A., Lever, R., Kingsbury, A. E., Biggs, C. S., & Whitton, P. S. (2008) *J. Neuroinflammation.* **5**, 19.
43. Martin, B., Golden, E., Carlson, O. D., Pistell, P., Zhou, J., Kim, W., Frank, B. P., Thomas, S., Chadwick, W. A., Greig, N. H. *et al.* (2009) *Diabetes* **58**, 318-328.
44. Li, Y., Perry, T., Kindy, M. S., Harvey, B. K., Tweedie, D., Holloway, H. W., Powers, K., Shen, H., Egan, J. M., Sambamurti, K. *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 1285-1290.
45. Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P., Velasco, P. T., Bigio, E. H., Finch, C. E. *et al.* (2004) *J. Neurosci.* **24**, 10191-10200.
46. Frisardi, V., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Capurso, C., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Vendemiale, G., Seripa, D., Pilotto, A., Capurso, A. *et al.* (2009) *Curr. Alzheimer Res.*
47. Lambert, M. P., Velasco, P. T., Chang, L., Viola, K. L., Fernandez, S., Lacor, P. N., Khuon, D., Gong, Y., Bigio, E. H., Shaw, P. *et al.* (2007) *J. Neurochem.* **100**, 23-35.
48. Kwinter, D. M., Lo, K., Mafi, P., & Silverman, M. A. (2009) *Neuroscience* **162**, 1001-1010.

V) DISCUSSÃO

Dentre as marcantes oportunidades que emergem do recente progresso em Neurociência, as perspectivas de compreensão e prevenção das doenças neurodegenerativas é uma realidade distante. Atualmente, existe um tratamento efetivo para várias condições neurológicas, mas para os mais de 20 milhões de pacientes acometidos com a doença de Alzheimer (DA) ao redor do mundo, esta não tem sido uma verdade (Ferri e cols., 2005). A DA é caracterizada por uma profunda perda de memória que progressivamente culmina com um quadro dramático de demência. Embora algumas poucas drogas tenham sido aprovadas para o tratamento da DA, seus benefícios são bastante modestos. Nenhum desses medicamentos aprovados é capaz de prevenir ou curar a DA. O que esses compostos fazem é retardar um pouco a progressão dos sintomas em um estágio inicial da doença. Dessa forma, com o passar de um pouco mais de cem anos da descrição inicial da doença, a falta de um tratamento efetivo com maior impacto pode ser desanimador. Entretanto, a pesquisa básica tem identificado alguns dos mecanismos que contribuem para esta doença devastadora, fornecendo oportunidades para o desenvolvimento de novas terapias que atingem as raízes causadoras da DA. Uma significativa atenção tem sido focada sobre essas estratégias, objetivando neutralizar os mecanismos que iniciam a perda de memória, principal manifestação inicial desta demência

Uma das questões misteriosas da DA é porque especificamente a memória é afetada nesta doença, e isto tem sido alvo de intensa investigação. É crescente o número de evidências que mostram que a deterioração morfológica e funcional de sinapses, centrais para a formação de memória, é induzida pelos oligômeros do peptídeo β amilóide ($A\beta$). Como descrito na Introdução dessa Dissertação, estes oligômeros são capazes de se ligar

especificamente a particulares sinapses, agindo como ligantes patogênicos (Gong e cols., 2003). O ataque dos oligômeros sobre as sinapses induz alterações patológicas semelhantes às encontradas na DA, como hiperfosforilação de tau, estresse oxidativo, deterioração e perda das sinapses (De Felice e cols., 2008; De Felice e cols., 2007; De Felice e cols., 2009). Esses achados possuem uma profunda relevância clínica, suportada por dados que demonstram um acúmulo significativo de oligômeros de A β no cérebro e no líquido cérebro espinhal de pacientes com DA (Gong e cols., 2003). A reunião das principais características patológicas induzidas pela ligação dos oligômeros de A β as sinapses fornece um potencial mecanismo para a patogênese da doença de Alzheimer (Klein, 2006; Ferreira e cols., 2007).

No presente trabalho, identificamos um novo impacto dos oligômeros de A β sobre os neurônios, bloqueando a sinalização de insulina. De maneira interessante, nossos dados indicam que mecanismos similares aos que ocorrem periféricamente em pacientes com diabetes tipo 2, também parecem ocorrer no cérebro de pacientes acometidos pela DA em resposta aos oligômeros de A β . De fato, observamos que níveis elevados de IRS1 com resíduos de serina 636 fosforilados são encontrados em cérebros de pacientes com transtorno cognitivo leve, uma fase que frequentemente antecede a progressão para DA. Achados ainda mais marcantes, mostrando a existência de resistência à insulina neuronal foram encontrados nos cérebros de pacientes com a doença de Alzheimer (Fig 1- Artigo). De forma interessante, nossos dados demonstram que os oligômeros iduziram uma anormal elevação dos níveis de IRS-1pSerina, reduzindo também a fosforilação em tirosina pelo receptor de insulina (IR). Outra observação importante, é que a inibição do IRS-1 ocorre em um curto período de tempo, 3 horas de exposição aos oligômeros de A β , sugerindo que este é um evento inicial de toxicidade que possivelmente ocorre nos estágios iniciais da doença.

Nos tecidos periféricos, a fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina vem sendo relacionada fortemente com resistência a insulina em casos patológicos como obesidade e diabetes tipo 2 (White, 2002). Portanto, nossos dados suportam a hipótese de que o cérebro de pacientes com DA são caracterizados por uma resistência a insulina no SNC como demonstrado inicialmente por Steen e cols., 2005. Em paralelo, nossos achados estendem os estudos iniciais de nosso grupo que mostraram de maneira pioneira, que os oligômeros têm papel central na indução na resistência à insulina neuronal (Zhao e cols., 2008; De Felice e cols., 2009).

Nos tecidos periféricos, um conhecido mecanismo de sinalização capaz de induzir um quadro de resistência à insulina envolve a ativação do receptor de TNF α , com a conseqüente ativação da JNK, pois o inibidor da JNK (SP600125) e o Infliximab, um anticorpo monoclonal neutralizante do TNF α solúvel preveniram a fosforilação anormal em serina do IRS-1 induzida pelos oligômeros. Esses compostos também preveniram a redução da fosforilação em tirosina, passo essencial na transmissão do sinal induzido pela insulina. Esses dados sugerem, portanto, que a inibição do IRS-1 nas células neuronais induzida pelos oligômeros possivelmente é mediada pela ativação da sinalização de TNF α e JNK. Esse mecanismo é similar ao mecanismo conhecido por induzir resistência à insulina periférica no diabetes tipo 2 e em doenças relacionadas a obesidade.

Estas duas condições patológicas são estreitamente associadas com um quadro de inflamação crônica, caracterizado por uma produção anormal de citocinas, como também pela ativação de uma complexa rede de vias de sinalização inflamatórias (Wellen and Hotamisligil, 2005). Evidências experimentais, epidemiológicas e clínicas produzidas na última década conectam causalmente os moduladores inflamatórios ao desenvolvimento de doenças metabólicas, particularmente diabetes tipo 2. (Wellen and Hotamisligil, 2005;

Shoelson e cols., 2006). Em resposta a esse quadro inflamatório, em casos de obesidade, a ativação de serina/treonina quinases, como a JNK, e a conseqüente inibição do IRS-1 são descritos como mecanismos centrais da resistência à insulina. Dados demonstram que uma dramática proteção contra a obesidade e diabetes foi observada em camundongos que não expressam JNK (Hirosumi e cols., 2002)

Camundongos obesos apresentam uma super produção de TNF α no tecido adiposo, fazendo um forte link entre a obesidade, diabetes e a inflamação crônica. (Hotamisligil e cols., 1993). Outros dados, também utilizando modelos de animais obesos que estão com a função de TNF α inibida, demonstram uma clara normalização da sensibilidade à insulina e da homeostase de glicose, reforçando a hipótese de que a resposta inflamatória desempenha um crítico papel da regulação da ação da insulina (Uysal e cols., 1997; Ventre e cols., 1997). Um aumento significativo da produção de TNF α é observado no tecido adiposo e muscular de humanos obesos (Hotamisligil e cols., 1995; Kern e cols., 1995; Saghizadeh e cols., 1996). E a administração exógena desta citocina leva a resistência à insulina (Krogh-Madsen e cols., 2006). De forma interessante, o uso, bem difundido, de um tratamento com agentes anti-TNF α em doenças inflamatórias tal como artrite reumatóide tem produzido um claro resultado secundário, melhorando a sinalização por insulina nestes pacientes, suportando a hipótese de um papel central do TNF α na sensibilidade sistêmica à insulina em humanos (Gonzalez-Gay e cols., 2006; Kiortsis e cols., 2005).

Trabalhos recentes demonstram que pacientes acometidos com a DA apresentam níveis elevados de TNF α no fluido cérebro espinhal, induzido por um crônico processo inflamatório em resposta ao A β (Tarkowski e cols., 1999). Em paralelo, os níveis elevados de TNF α são apontados como os mediadores da inibição da LTP induzida pelos oligômeros (Wang e cols., 2005) e vem sendo correlacionado com a progressão da doença (Tarkowski

e cols., 2003). De maneira interessante, um trabalho recente mostrou que o infliximab foi capaz de prevenir a inibição da LTP causada pelos oligômeros (Hu e cols., 2009). Dado o importante papel da insulina na plasticidade sináptica (Zhao e cols., 2004), nossos resultados fornecem um possível mecanismo para explicar o efeito benéfico do Infliximab na LTP. Este composto é utilizado no tratamento de doenças inflamatórias como artrite reumatóide, e vem sendo recentemente proposto como um novo tratamento para o diabetes tipo 2. Realmente, o tratamento com Infliximab foi capaz de recuperar a homeostase de glicose em animais diabéticos (Araujo e cols., 2007). De forma muito interessante, nossos presentes resultados sugerem que modulação da sinalização de TNF α pode constituir um novo e eficiente mecanismo para proteger os neurônios contra o bloqueio da sinalização por insulina e da deterioração das sinapses na DA.

Um recente trabalho demonstrou que indivíduos que apresentam uma produção elevada de TNF α apresentam um risco considerável de desenvolver a doença de Alzheimer (Tan e cols., 2007). Desse modo, a utilização de terapias anti-TNF α seria promissora no tratamento deste processo neuroinflamatório. Um trabalho recente demonstra uma melhora cognitiva clara e significativa em pacientes acometidos pela DA, os quais receberam uma dose periespinal de etanercepte, um anticorpo monoclonal anti-TNF α (Tobinick and Gross, 2008a; Tobinick, 2007). Os intrigantes resultados deste estudo mostram que dentro de minutos após a primeira dose de etanercepte, o paciente apresentou uma profunda melhora na sua atenção, comportamento e orientação (Tobinick and Gross, 2008a; Tobinick and Gross, 2008b; Tobinick, 2007). Essa rápida melhora cognitiva seguida da administração periespinal de etanercepte sugere a existência de uma imediata reversão dos mecanismos patofisiológicos na DA mediados pelo TNF α , possivelmente por prevenir os

efeitos tóxicos desta citocina sobre a atividade sináptica (Chang e cols., 2006; Stellwagen and Malenka, 2006).

Sabe-se que para desenvolvimento, função e sobrevivência de uma célula neuronal é um eficiente transporte axonal é necessário (De Vos e cols., 2008). Diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a DA, demonstram uma disfunção no transporte axonal de proteínas, organelas como as mitocôndrias, importante para geração de energia na terminação pré-sináptica. Comprometendo desta forma uma importante função fisiológica dos neurônios. Um grande número de trabalhos demonstra que a ativação de JNK possui um importante papel no bloqueio do transporte axonal (De Vos e cols., 2008). Dados recentes de nosso grupo mostram que oligômeros inibem o transporte axonal em neurônios hipocâmpais (Decker, H. e cols., submetido). Desta forma, nós testamos a hipótese de que a ativação da JNK pelos oligômeros seria responsável pela deficiência no transporte axonal. De forma muito interessante, o tratamento prévio com o inibidor da JNK preveniu de forma significativa a inibição do transporte nos neurônios hipocâmpais. Dados adicionais de Decker e cols. mostram que o tratamento das culturas com um inibidor de GSK3 β , preveniu o bloqueio do transporte. Nesse sentido, nossos dados sugerem um possível mecanismo pelo qual os oligômeros de A β induzem o bloqueio do transporte axonal. E ainda, reforçam a hipótese da importância da manutenção da sinalização por insulina para a fisiologia das células neuronais.

Até os dias atuais, as abordagens terapêuticas utilizadas para o tratamento da DA falham em retardar a progressão rápida dos sintomas, e a necessidade por novas e efetivas estratégias ainda existe. Nosso grupo vem investigando mecanismos celulares que fisiologicamente protejam as sinapses contra o efeito tóxico dos oligômeros do peptídeo A β . Esse mecanismo protetor poderia contribuir para preservar a função cognitiva em

indivíduos saudáveis, por outro lado, tal mecanismo estaria deficiente em pacientes em estágios iniciais da doença de Alzheimer e ainda poderia servir como alvo de drogas terapêuticas. Recentes trabalhos são consistentes em mostrar que um desses mecanismos de proteção poderia ser fornecido pela sinalização de insulina do SNC, dada a importância do sinal induzido pela insulina em processos de plasticidade sináptica. Além disso, recentes trabalhos vêm demonstrando que a insulina e drogas que aumentam a sensibilidade à insulina, como a rosiglitazona, melhoram a performance cognitiva em modelos de animais transgênicos para a DA, e ainda, em pacientes em estágios iniciais desta doença (Dhamoon e cols., 2009; Pedersen e cols., 2006). Nosso grupo demonstrou recentemente que o tratamento prévio de culturas de neurônios hipocâmpais maduras com insulina bloqueou a ligação dos oligômeros aos neurônios. Essa proteção é dependente da atividade tirosina quinase do receptor de insulina, sugerindo que ambos, insulina e oligômeros, não competem pelo mesmo sítio de ligação (De Felice e cols., 2009). Ainda neste trabalho, o tratamento com insulina protegeu contra o estresse oxidativo induzido pelos oligômeros (De Felice e cols., 2009), que inclusive é uma característica patológica presente no cérebro de pacientes com DA (De Felice e cols., 2007). Outro dado muito interessante foi a proteção pela insulina contra a profunda perda de sinapses induzidas por estas toxinas (De Felice e cols., 2009). No presente trabalho, o tratamento com insulina preveniu contra a inibição do IRS-1 induzida pelos oligômeros. Esses dados vêm reforçar o papel neuroprotetor da insulina contra os danos tóxicos do A β , e ainda, sugerem a sinalização deste hormônio como um alvo de estudos, para produção de ferramentas úteis na intervenção terapêutica na DA.

Ainda na busca por uma abordagem terapêutica alternativa, nós investigamos o mais novo medicamento aprovado para o tratamento de diabetes tipo 2, cujo princípio ativo é o

composto Exendina-4. Esse é um peptídeo agonista seletivo de longa duração do receptor de GLP-1, e a ativação deste, ativa proteínas da via de sinalização de insulina, o que caracteriza seu papel insulínico, bem caracterizado em tecidos periféricos. No SNC, estimulação do receptor de GLP-1 está envolvida em processos de plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal (Abbas e cols., 2009). Exendina-4 cruza prontamente a barreira hemato-encefálica, e tem demonstrado um efeito neuroprotetor em modelos animais para quadros isquêmicos, doença de Parkinson e Huntington (Martin e cols., 2009; Li e cols., 2009). No presente trabalho, nós encontramos um efeito bastante interessante, onde o Exendin-4 foi capaz de prevenir a inibição do IRS-1 pelos oligômeros de A β . Além disso, a ligação dos oligômeros aos neurônios não foi inibida pelo tratamento com Exendina-4, sugerindo que a proteção por este peptídeo envolve vias de sinalização intracelular que bloqueiam estes danos celulares provocados pelos oligômeros. Outra informação muito importante é que tanto o Exendina-4, quanto a Insulina, preveniram o bloqueio do transporte axonal induzido pelos oligômeros. Reforçando a hipótese de que a manutenção da sinalização por insulina é fundamental para preservar uma função fisiológica, de tamanha importância, como o transporte axonal de organelas.

Em conclusão, observamos que oligômeros do peptídeo β -amilóide, potentes toxinas da doença de Alzheimer, induzem uma fosforilação anormal do IRS-1 em resíduos de serina, fornecendo uma relevante base patogênica para explicar a presença de IRS-1pSerina que observamos no cérebro de pacientes com transtorno cognitivo leve e em pacientes acometidos pela doença de Alzheimer. Nossos dados ainda indicam, que a inibição desta importante proteína para a sinalização de insulina pelos oligômeros, é mediada pela ativação da sinalização de TNF α e JNK. Mecanismo este similar ao observado para resistência a insulina periférica em casos de diabetes tipo 2. De forma

interessante, a inibição do IRS-1 foi completamente prevenida pela Insulina e pelo Exendina-4. A estimulação da sinalização por insulina também foi capaz de preservar o transporte axonal em neurônios expostos aos oligômeros. Nosso conjunto de resultados fornece uma base molecular para o recente conceito de que a deficiência da sinalização por insulina da doença de Alzheimer se manifesta como uma nova forma de diabetes. Além disso, traz informações relevantes para o estudo da patogênese da DA, e pode contribuir para o desenvolvimento de novas e eficientes abordagens terapêuticas. Fico muito feliz com a conclusão deste trabalho, e espero, como uma neurocientista em formação, continuar trabalhando para que, num futuro não muito distante, as pessoas possam preservar por toda vida seu patrimônio mais valioso, suas memórias.

V) REFERÊNCIAS

1. ABBAS T., FAIVRE E., HOLSCHER C. (2009) Impairment of synaptic plasticity and memory formation in GLP-1 receptor KO mice: Interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Behav.Brain Res.** 205:1, 265-271.
2. ABBOTT M. A., WELLS D. G., FALLON J. R. (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. **J.Neurosci.** 19:17, 7300-7308.
3. AKIYAMA H., BARGER S., BARNUM S., BRADT B., BAUER J., COLE G. M., COOPER N. R., EIKELBOOM P., EMMERLING M., FIEBICH B. L., FINCH C. E., FRAUTSCHY S., GRIFFIN W. S., HAMPEL H., HULL M., LANDRETH G., LUE L., MRAK R., MACKENZIE I. R., MCGEER P. L., O'BANION M. K., PACHTER J., PASINETTI G., PLATA-SALAMAN C., ROGERS J., RYDEL R., SHEN Y., STREIT W., STROHMEYER R., TOOYOMA I., VAN MUISWINKEL F. L., VEERHUIS R., WALKER D., WEBSTER S., WEGRZYNIAK B., WENK G., WYSS-CORAY T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol.Aging** 21:3, 383-421.
4. ALBENSI B. C. e MATTSON M. P. (2000) Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. **Synapse** 35:2, 151-159.
5. ALESSI D. R., JAMES S. R., DOWNES C. P., HOLMES A. B., GAFFNEY P. R., REESE C. B., COHEN P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. **Curr.Biol.** 7:4, 261-269.
6. ALZHEIMER A., STELZMANN R. A., SCHNITZLEIN H. N., MURTAGH F. R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". **Clin.Anat.** 8:6, 429-431.
7. AVRUCH J. (1998) Insulin signal transduction through protein kinase cascades. **Mol.Cell Biochem.** 182:1-2, 31-48.
8. BAKER J., LIU J. P., ROBERTSON E. J., EFSTRATIADIS A. (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. **Cell** 75:1, 73-82.

9. BANKS W. A. (2004) The source of cerebral insulin. **Eur.J.Pharmacol.** 490:1-3, 5-12.
10. BARGER S. W. e HARMON A. D. (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. **Nature** 388:6645, 878-881.
11. BASKIN D. G., FIGLEWICZ D. P., WOODS S. C., PORTE D., Jr., DORSA D. M. (1987) Insulin in the brain. **Annu.Rev.Physiol** 49, 335-347.
12. BASKIN D. G., PORTE D., Jr., GUEST K., DORSA D. M. (1983a) Regional concentrations of insulin in the rat brain. **Endocrinology** 112:3, 898-903.
13. BASKIN D. G., WOODS S. C., WEST D. B., VAN H. M., POSNER B. I., DORSA D. M., PORTE D., Jr. (1983b) Immunocytochemical detection of insulin in rat hypothalamus and its possible uptake from cerebrospinal fluid. **Endocrinology** 113:5, 1818-1825.
14. BAUMANN C. A., RIBON V., KANZAKI M., THURMOND D. C., MORA S., SHIGEMATSU S., BICKEL P. E., PESSIN J. E., SALTIEL A. R. (2000) CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature** 407:6801, 202-207.
15. BAZAN J. F. (1993) Emerging families of cytokines and receptors. **Curr.Biol.** 3:9, 603-606.
16. BEATTIE E. C., STELLWAGEN D., MORISHITA W., BRESNAHAN J. C., HA B. K., VON Z. M., BEATTIE M. S., MALENKA R. C. (2002) Control of synaptic strength by glial TNFalpha. **Science** 295:5563, 2282-2285.
17. BENNETT M. R. (2000) The concept of long term potentiation of transmission at synapses. **Prog.Neurobiol.** 60:2, 109-137.
18. BERTRAM L. e TANZI R. E. (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. **J.Clin.Invest** 115:6, 1449-1457.
19. BIESSELS G. J., VAN DER HEIDE L. P., KAMAL A., BLEYS R. L., GISPEN W. H. (2002) Ageing and diabetes: implications for brain function. **Eur.J.Pharmacol.** 441:1-2, 1-14.

20. BRAAK H. e BRAAK E. (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. **J.Neural Transm.Suppl** 53, 127-140.
21. BRITSCHGI M. e WYSS-CORAY T. (2007) Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. **Int.Rev.Neurobiol.** 82, 205-233.
22. BROOKMEYER R., JOHNSON E., ZIEGLER-GRAHAM K., ARRIGHI H. M. (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. **Alzheimers.Dement.** 3:3, 186-191.
23. BRUNET A., DATTA S. R., GREENBERG M. E. (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. **Curr.Opin.Neurobiol.** 11:3, 297-305.
24. CAGNIN A., BROOKS D. J., KENNEDY A. M., GUNN R. N., MYERS R., TURKHEIMER F. E., JONES T., BANATI R. B. (2001) In-vivo measurement of activated microglia in dementia. **Lancet** 358:9280, 461-467.
25. CALON F., LIM G. P., YANG F., MORIHARA T., TETER B., UBEDA O., ROSTAING P., TRILLER A., SALEM N., Jr., ASHE K. H., FRAUTSCHY S. A., COLE G. M. (2004) Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. **Neuron** 43:5, 633-645.
26. CANTLEY L. C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science** 296:5573, 1655-1657.
27. CASH A. D., ALIEV G., SIEDLAK S. L., NUNOMURA A., FUJIOKA H., ZHU X., RAINA A. K., VINTERS H. V., TABATON M., JOHNSON A. B., PAULA-BARBOSA M., AVILA J., JONES P. K., CASTELLANI R. J., SMITH M. A., PERRY G. (2003) Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. **Am.J.Pathol.** 162:5, 1623-1627.
28. CAVALLI V., KUJALA P., KLUMPERMAN J., GOLDSTEIN L. S. (2005) Sunday Driver links axonal transport to damage signaling. **J.Cell Biol.** 168:5, 775-787.
29. CHANG E. H., SAVAGE M. J., FLOOD D. G., THOMAS J. M., LEVY R. B., MAHADOMRONGKUL V., SHIRAO T., AOKI C., HUERTA P. T. (2006) AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 103:9, 3410-3415.

30. CHANG L. e KARIN M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature** 410:6824, 37-40.
31. CHEN G. e GOEDDEL D. V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science** 296:5573, 1634-1635.
32. CHIANG S. H., BAUMANN C. A., KANZAKI M., THURMOND D. C., WATSON R. T., NEUDAUER C. L., MACARA I. G., PESSIN J. E., SALTIEL A. R. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature** 410:6831, 944-948.
33. CLARKE D. W., MUDD L., BOYD F. T., Jr., FIELDS M., RAIZADA M. K. (1986) Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. **J.Neurochem.** 47:3, 831-836.
34. COMBS C. K., KARLO J. C., KAO S. C., LANDRETH G. E. (2001) beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. **J.Neurosci.** 21:4, 1179-1188.
35. CRAFT S., PESKIND E., SCHWARTZ M. W., SCHELLENBERG G. D., RASKIND M., PORTE D., Jr. (1998) Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. **Neurology** 50:1, 164-168.
36. CRAFT S. e WATSON G. S. (2004) Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. **Lancet Neurol.** 3:3, 169-178.
37. CRAS P., KAWAI M., LOWERY D., GONZALEZ-DEWHITT P., GREENBERG B., PERRY G. (1991) Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 88:17, 7552-7556.
38. DAI J., BUIJS R. M., KAMPHORST W., SWAAB D. F. (2002) Impaired axonal transport of cortical neurons in Alzheimer's disease is associated with neuropathological changes. **Brain Res.** 948:1-2, 138-144.
39. DE FELICE F. G., VELASCO P. T., LAMBERT M. P., VIOLA K., FERNANDEZ S. J., FERREIRA S. T., KLEIN W. L. (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism

that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **J.Biol.Chem.** 282:15, 11590-11601.

40. DE FELICE F. G., VIEIRA M. N., BOMFIM T. R., DECKER H., VELASCO P. T., LAMBERT M. P., VIOLA K. L., ZHAO W. Q., FERREIRA S. T., KLEIN W. L. (2009) Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 106:6, 1971-1976.
41. DE FELICE F. G., WU D., LAMBERT M. P., FERNANDEZ S. J., VELASCO P. T., LACOR P. N., BIGIO E. H., JERECIC J., ACTON P. J., SHUGHRUE P. J., CHEN-DODSON E., KINNEY G. G., KLEIN W. L. (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. **Neurobiol.Aging** 29:9, 1334-1347.
42. DE VOS K. J., GRIERSON A. J., ACKERLEY S., MILLER C. C. (2008) Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. **Annu.Rev.Neurosci.** 31, 151-173.
43. DEACON C. F., NAUCK M. A., TOFT-NIELSEN M., PRIDAL L., WILLMS B., HOLST J. J. (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. **Diabetes** 44:9, 1126-1131.
44. DELTOUR L., MONTAGUTELLI X., GUENET J. L., JAMI J., PALDI A. (1995) Tissue- and developmental stage-specific imprinting of the mouse proinsulin gene, *Ins2*. **Dev.Biol.** 168:2, 686-688.
45. DENTON R. M. e TAVARE J. M. (1995) Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. **Eur.J.Biochem.** 227:3, 597-611.
46. DERKACH V. A., OH M. C., GUIRE E. S., SODERLING T. R. (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. **Nat.Rev.Neurosci.** 8:2, 101-113.
47. DESAI A. e MITCHISON T. J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. **Annu.Rev.Cell Dev.Biol.** 13, 83-117.

48. DEVASKAR S. U., GIDDINGS S. J., RAJAKUMAR P. A., CARNAGHI L. R., MENON R. K., ZAHM D. S. (1994) Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. **J.Biol.Chem.** 269:11, 8445-8454.
49. DHAMOON M. S., NOBLE J. M., CRAFT S. (2009) Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. **Neurology** 72:3, 292-293.
50. DICKSON B. J. (2003) Development. Wiring the brain with insulin. **Science** 300:5618, 440-441.
51. DOU J. T., CHEN M., DUFOUR F., ALKON D. L., ZHAO W. Q. (2005) Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. **Learn.Mem.** 12:6, 646-655.
52. DUDEK H., DATTA S. R., FRANKE T. F., BIRNBAUM M. J., YAO R., COOPER G. M., SEGAL R. A., KAPLAN D. R., GREENBERG M. E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. **Science** 275:5300, 661-665.
53. DURING M. J., CAO L., ZUZGA D. S., FRANCIS J. S., FITZSIMONS H. L., JIAO X., BLAND R. J., KLUGMANN M., BANKS W. A., DRUCKER D. J., HAILE C. N. (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. **Nat.Med.** 9:9, 1173-1179.
54. EIKELENBOOM P., VEERHUIS R., SCHEPER W., ROZEMULLER A. J., VAN GOOL W. A., HOOZEMANS J. J. (2006) The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. **J.Neural Transm.** 113:11, 1685-1695.
55. ELDAR-FINKELMAN H. e KREBS E. G. (1997) Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 94:18, 9660-9664.
56. FEHMANN H. C., JIANG J., SCHWEINFURTH J., DORSCH K., WHEELER M. B., BOYD A. E., III, GOKE B. (1994) Ligand-specificity of the rat GLP-I receptor recombinantly expressed in Chinese hamster ovary (CHO-) cells. **Z.Gastroenterol.** 32:4, 203-207.
57. FERREIRA S. T., VIEIRA M. N., DE FELICE F. G. (2007) Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. **IUBMB.Life** 59:4-5, 332-345.

58. FETLER L. e AMIGORENA S. (2005) Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. **Science** 309:5733, 392-393.
59. FLODEN A. M., LI S., COMBS C. K. (2005) Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. **J.Neurosci.** 25:10, 2566-2575.
60. FOORD S. M., BONNER T. I., NEUBIG R. R., ROSSER E. M., PIN J. P., DAVENPORT A. P., SPEDDING M., HARMAR A. J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. **Pharmacol.Rev.** 57:2, 279-288.
61. FRAUTSCHY S. A., YANG F., IRRIZARRY M., HYMAN B., SAIDO T. C., HSIAO K., COLE G. M. (1998) Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. **Am.J.Pathol.** 152:1, 307-317.
62. FRIEDMAN D. S. e VALE R. D. (1999) Single-molecule analysis of kinesin motility reveals regulation by the cargo-binding tail domain. **Nat.Cell Biol.** 1:5, 293-297.
63. GAO Z., HWANG D., BATAILLE F., LEFEVRE M., YORK D., QUON M. J., YE J. (2002) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. **J.Biol.Chem.** 277:50, 48115-48121.
64. GAULT V. A. e HOLSCHER C. (2008) GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid. **Eur.J.Pharmacol.** 587:1-3, 112-117.
65. GEULA C., WU C. K., SAROFF D., LORENZO A., YUAN M., YANKNER B. A. (1998) Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. **Nat.Med.** 4:7, 827-831.
66. GIDDINGS S. J., CHIRGWIN J. M., PERMUTT M. A. (1985) Glucose regulated insulin biosynthesis in isolated rat pancreatic islets is accompanied by changes in proinsulin mRNA. **Diabetes Res.** 2:2, 71-75.
67. GLENNER G. G. e WONG C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 120:3, 885-890.

68. GONG Y., CHANG L., VIOLA K. L., LACOR P. N., LAMBERT M. P., FINCH C. E., KRAFFT G. A., KLEIN W. L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 100:18, 10417-10422.
69. GOTO Y., NIIDOME T., AKAIKE A., KIHARA T., SUGIMOTO H. (2006) Amyloid beta-peptide preconditioning reduces glutamate-induced neurotoxicity by promoting endocytosis of NMDA receptor. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 351:1, 259-265.
70. GRAFSTEIN B. e FORMAN D. S. (1980) Intracellular transport in neurons. **Physiol Rev.** 60:4, 1167-1283.
71. GRALLE M. e FERREIRA S. T. (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. **Prog.Neurobiol.** 82:1, 11-32.
72. GRELL M., DOUNI E., WAJANT H., LOHDEN M., CLAUSS M., MAXEINER B., GEORGOPOULOS S., LESSLAUER W., KOLLIAS G., PFIZENMAIER K., SCHEURICH P. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell** 83:5, 793-802.
73. GRIFFIN W. S. (2006) Inflammation and neurodegenerative diseases. **Am.J.Clin.Nutr.** 83:2, 470S-474S.
74. GRIFFIN W. S., SHENG J. G., ROYSTON M. C., GENTLEMAN S. M., MCKENZIE J. E., GRAHAM D. I., ROBERTS G. W., MRAK R. E. (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. **Brain Pathol.** 8:1, 65-72.
75. GUILHERME A., VIRBASCIUS J. V., PURI V., CZECH M. P. (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat.Rev.Mol.Cell Biol.** 9:5, 367-377.
76. HALASSA M. M., FELLIN T., HAYDON P. G. (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends Mol.Med.** 13:2, 54-63.

77. HARANAKA K., SATOMI N., SAKURAI A. (1984) [Antitumor activity of tumor necrosis factor (TNF) in vitro and in vivo]. **Gan To Kagaku Ryoho** 11:7, 1387-1393.
78. HARDY J. e SELKOE D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science** 297:5580, 353-356.
79. HARDY J. A. e HIGGINS G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science** 256:5054, 184-185.
80. HAVRANKOVA J., ROTH J., BROWNSTEIN M. J. (1983) Insulin receptors in brain. **Adv.Metab Disord.** 10, 259-268.
81. HAVRANKOVA J., SCHMECHEL D., ROTH J., BROWNSTEIN M. (1978) Identification of insulin in rat brain. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 75:11, 5737-5741.
82. HAY C. W., SINCLAIR E. M., BERMANO G., DURWARD E., TADAYYON M., DOCHERTY K. (2005) Glucagon-like peptide-1 stimulates human insulin promoter activity in part through cAMP-responsive elements that lie upstream and downstream of the transcription start site. **J.Endocrinol.** 186:2, 353-365.
83. HEBERT L. E., SCHERR P. A., BIENIAS J. L., BENNETT D. A., EVANS D. A. (2003) Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. **Arch.Neurol.** 60:8, 1119-1122.
84. HELLSTROM A., PERRUZZI C., JU M., ENGSTROM E., HARD A. L., LIU J. L., ALBERTSSON-WIKLAND K., CARLSSON B., NIKLASSON A., SJODELL L., LEROITH D., SENGER D. R., SMITH L. E. (2001) Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 98:10, 5804-5808.
85. HENEKA M. T. e O'BANION M. K. (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **J.Neuroimmunol.** 184:1-2, 69-91.
86. HENEKA M. T., SASTRE M., DUMITRESCU-OZIMEK L., DEWACHTER I., WALTER J., KLOCKGETHER T., VAN L. F. (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. **J.Neuroinflammation.** 2, 22.

87. HIROKAWA N. (1982) Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. **J.Cell Biol.** 94:1, 129-142.
88. HIROKAWA N. (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science** 279:5350, 519-526.
89. HIROKAWA N. e TAKEMURA R. (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. **Nat.Rev.Neurosci.** 6:3, 201-214.
90. HIROSUMI J., TUNCMAN G., CHANG L., GORGUN C. Z., UYSAL K. T., MAEDA K., KARIN M., HOTAMISLIGIL G. S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature** 420:6913, 333-336.
91. HIRUMA H., KATAKURA T., TAKAHASHI S., ICHIKAWA T., KAWAKAMI T. (2003) Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms. **J.Neurosci.** 23:26, 8967-8977.
92. HOTAMISLIGIL G. S., MURRAY D. L., CHOY L. N., SPIEGELMAN B. M. (1994) Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 91:11, 4854-4858.
93. HOTAMISLIGIL G. S., PERALDI P., BUDAVARI A., ELLIS R., WHITE M. F., SPIEGELMAN B. M. (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science** 271:5249, 665-668.
94. HOTAMISLIGIL G. S., SHARGILL N. S., SPIEGELMAN B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science** 259:5091, 87-91.
95. HSIEH H., BOEHM J., SATO C., IWATSUBO T., TOMITA T., SISODIA S., MALINOW R. (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. **Neuron** 52:5, 831-843.
96. HU N. W., KLYUBIN I., ANWY R., ROWAN M. J. (2009) GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent Abeta-mediated synaptic plasticity disruption in vivo. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 106:48, 20504-20509.

97. HUANG C. C., LEE C. C., HSU K. S. (2004) An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. **J.Neurochem.** 89:1, 217-231.
98. INOUE M., CHANG L., HWANG J., CHIANG S. H., SALTIEL A. R. (2003) The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. **Nature** 422:6932, 629-633.
99. JACOBSEN J. S., WU C. C., REDWINE J. M., COMERY T. A., ARIAS R., BOWLBY M., MARTONE R., MORRISON J. H., PANGALOS M. N., REINHART P. H., BLOOM F. E. (2006) Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 103:13, 5161-5166.
100. JOB C. e EBERWINE J. (2001) Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. **Nat.Rev.Neurosci.** 2:12, 889-898.
101. KAHN B. B. e FLIER J. S. (2000) Obesity and insulin resistance. **J.Clin.Invest** 106:4, 473-481.
102. KALARIA R. N., MAESTRE G. E., ARIZAGA R., FRIEDLAND R. P., GALASKO D., HALL K., LUCHSINGER J. A., OGUNNIYI A., PERRY E. K., POTOCHNIK F., PRINCE M., STEWART R., WIMO A., ZHANG Z. X., ANTUONO P. (2008) Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. **Lancet Neurol.** 7:9, 812-826.
103. KAMAL A., STOKIN G. B., YANG Z., XIA C. H., GOLDSTEIN L. S. (2000) Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. **Neuron** 28:2, 449-459.
104. KAWARABAYASHI T., SHOJI M., YAMAGUCHI H., TANAKA M., HARIGAYA Y., ISHIGURO K., HIRAI S. (1993) Amyloid beta protein precursor accumulates in swollen neurites throughout rat brain with aging. **Neurosci.Lett.** 153:1, 73-76.
105. KIORTSIS D. N., MAVRIDIS A. K., VASAKOS S., NIKAS S. N., DROSOS A. A. (2005) Effects of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. **Ann.Rheum.Dis.** 64:5, 765-766.

106. KLEIN W. L. (2006) Synaptic targeting by A beta oligomers (ADDLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease. **Alzheimers.Dement.** 2:1, 43-55.
107. KNUDSEN L. B. (2004) Glucagon-like peptide-1: the basis of a new class of treatment for type 2 diabetes. **J.Med.Chem.** 47:17, 4128-4134.
108. KREYMANN B., WILLIAMS G., GHATEI M. A., BLOOM S. R. (1987) Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. **Lancet** 2:8571, 1300-1304.
109. KROGH-MADSEN R., PLOMGAARD P., MOLLER K., MITTENDORFER B., PEDERSEN B. K. (2006) Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. **Am.J.Physiol Endocrinol.Metab** 291:1, E108-E114.
110. LACOR P. N., BUNIEL M. C., CHANG L., FERNANDEZ S. J., GONG Y., VIOLA K. L., LAMBERT M. P., VELASCO P. T., BIGIO E. H., FINCH C. E., KRAFFT G. A., KLEIN W. L. (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. **J.Neurosci.** 24:45, 10191-10200.
111. LACOR P. N., BUNIEL M. C., FURLOW P. W., CLEMENTE A. S., VELASCO P. T., WOOD M., VIOLA K. L., KLEIN W. L. (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. **J.Neurosci.** 27:4, 796-807.
112. LAMBERT M. P., BARLOW A. K., CHROMY B. A., EDWARDS C., FREED R., LIOSATOS M., MORGAN T. E., ROZOVSKY I., TROMMER B., VIOLA K. L., WALSH P., ZHANG C., FINCH C. E., KRAFFT G. A., KLEIN W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 95:11, 6448-6453.
113. LAMBERT M. P., VELASCO P. T., CHANG L., VIOLA K. L., FERNANDEZ S., LACOR P. N., KHUON D., GONG Y., BIGIO E. H., SHAW P., DE FELICE F. G., KRAFFT G. A., KLEIN W. L. (2007) Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. **J.Neurochem.** 100:1, 23-35.
114. LAMONTE B. H., WALLACE K. E., HOLLOWAY B. A., SHELLY S. S., ASCANO J., TOKITO M., VAN W. T., HOWLAND D. S., HOLZBAUR E. L. (2002) Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. **Neuron** 34:5, 715-727.

115. LANZ T. A., CARTER D. B., MERCHANT K. M. (2003) Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. **Neurobiol.Dis.** 13:3, 246-253.
116. LAU C. G. e ZUKIN R. S. (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. **Nat.Rev.Neurosci.** 8:6, 413-426.
117. LE R. D. e ZICK Y. (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. **Diabetes Care** 24:3, 588-597.
118. LEE Y. H., GIRAUD J., DAVIS R. J., WHITE M. F. (2003) c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **J.Biol.Chem.** 278:5, 2896-2902.
119. LI J., DEFEA K., ROTH R. A. (1999) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **J.Biol.Chem.** 274:14, 9351-9356.
120. LI Y., PERRY T., KINDY M. S., HARVEY B. K., TWEEDIE D., HOLLOWAY H. W., POWERS K., SHEN H., EGAN J. M., SAMBAMURTI K., BROSSI A., LAHIRI D. K., MATTSON M. P., HOFFER B. J., WANG Y., GREIG N. H. (2009) GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 106:4, 1285-1290.
121. LIU J. P., BAKER J., PERKINS A. S., ROBERTSON E. J., EFSTRATIADIS A. (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). **Cell** 75:1, 59-72.
122. LIU Y. F., PAZ K., HERSCHKOVITZ A., ALT A., TENNENBAUM T., SAMPSON S. R., OHBA M., KUROKI T., LEROITH D., ZICK Y. (2001) Insulin stimulates PKCzeta -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. **J.Biol.Chem.** 276:17, 14459-14465.
123. LIZCANO J. M. e ALESSI D. R. (2002) The insulin signalling pathway. **Curr.Biol.** 12:7, R236-R238.
124. LOCKSLEY R. M., KILLEEN N., LENARDO M. J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell** 104:4, 487-501.

125. LUE L. F., WALKER D. G., ROGERS J. (2001) Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. **Neurobiol.Aging** 22:6, 945-956.
126. MACKAY D. J. e HALL A. (1998) Rho GTPases. **J.Biol.Chem.** 273:33, 20685-20688.
127. MALENKA R. C. (2003) Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** 1003, 1-11.
128. MAN H. Y., WANG Q., LU W. Y., JU W., AHMADIAN G., LIU L., D'SOUZA S., WONG T. P., TAGHIBIGLOU C., LU J., BECKER L. E., PEI L., LIU F., WYMAN M. P., MACDONALD J. F., WANG Y. T. (2003) Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. **Neuron** 38:4, 611-624.
129. MARMENOUT A., FRANSEN L., TAVERNIER J., VAN DER HEYDEN J., TIZARD R., KAWASHIMA E., SHAW A., JOHNSON M. J., SEMON D., MULLER R., . (1985) Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. **Eur.J.Biochem.** 152:3, 515-522.
130. MASTERS C. L., MULTHAUP G., SIMMS G., POTTGIESSER J., MARTINS R. N., BEYREUTHER K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. **EMBO J.** 4:11, 2757-2763.
131. MATTSON M. P., PERRY T., GREIG N. H. (2003) Learning from the gut. **Nat.Med.** 9:9, 1113-1115.
132. MCGEER E. G. e MCGEER P. L. (2003) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry** 27:5, 741-749.
133. MCGEER P. L., KAWAMATA T., WALKER D. G., AKIYAMA H., TOOYAMA I., MCGEER E. G. (1993) Microglia in degenerative neurological disease. **Glia** 7:1, 84-92.
134. MCGEER P. L., ROGERS J., MCGEER E. G. (2006) Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. **J.Alzheimers.Dis.** 9:3 Suppl, 271-276.

135. MCGEER P. L., SCHULZER M., MCGEER E. G. (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. **Neurology** 47:2, 425-432.
136. MCINTYRE N., HOLDSWORTH C. D., TURNER D. S. (1964) NEW INTERPRETATION OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE. **Lancet** 2:7349, 20-21.
137. MOOLMAN D. L., VITOLO O. V., VONSATTEL J. P., SHELANSKI M. L. (2004) Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. **J.Neurocytol.** 33:3, 377-387.
138. MOTHE I. e VAN O. E. (1996) Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. **J.Biol.Chem.** 271:19, 11222-11227.
139. MYERS M. G., Jr., BACKER J. M., SUN X. J., SHOELSON S., HU P., SCHLESSINGER J., YOAKIM M., SCHAFFHAUSEN B., WHITE M. F. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 89:21, 10350-10354.
140. NAKAE J., PARK B. C., ACCILI D. (1999) Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. **J.Biol.Chem.** 274:23, 15982-15985.
141. NEWGARD C. B. e MCGARRY J. D. (1995) Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. **Annu.Rev.Biochem.** 64, 689-719.
142. NIEWIADOMSKA G. e BAKSALERSKA-PAZERA M. (2003) Age-dependent changes in axonal transport and cellular distribution of Tau 1 in the rat basal forebrain neurons. **Neuroreport** 14:13, 1701-1706.
143. PATTI M. E. e KAHN C. R. (1998) The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J.Basic Clin.Physiol Pharmacol.** 9:2-4, 89-109.
144. PAWSON T. (1995) Protein modules and signalling networks. **Nature** 373:6515, 573-580.
145. PAWSON T. e SCOTT J. D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science** 278:5346, 2075-2080.

146. PAZ K., HEMI R., LEROITH D., KARASIK A., ELHANANY E., KANETY H., ZICK Y. (1997) A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. **J.Biol.Chem.** 272:47, 29911-29918.
147. PAZ K., LIU Y. F., SHORER H., HEMI R., LEROITH D., QUAN M., KANETY H., SEGER R., ZICK Y. (1999) Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. **J.Biol.Chem.** 274:40, 28816-28822.
148. PEDERSEN W. A., MCMILLAN P. J., KULSTAD J. J., LEVERENZ J. B., CRAFT S., HAYNATZKI G. R. (2006) Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. **Exp.Neurol.** 199:2, 265-273.
149. PEDERSON T. M., KRAMER D. L., RONDINONE C. M. (2001) Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. **Diabetes** 50:1, 24-31.
150. PERRY T., HAUGHEY N. J., MATTSON M. P., EGAN J. M., GREIG N. H. (2002) Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. **J.Pharmacol.Exp.Ther.** 302:3, 881-888.
151. PETE G., FULLER C. R., OLDHAM J. M., SMITH D. R., D'ERCOLE A. J., KAHN C. R., LUND P. K. (1999) Postnatal growth responses to insulin-like growth factor I in insulin receptor substrate-1-deficient mice. **Endocrinology** 140:12, 5478-5487.
152. PETERSON R. T. e SCHREIBER S. L. (1999) Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. **Curr.Biol.** 9:14, R521-R524.
153. PICKERING M., CUMISKEY D., O'CONNOR J. J. (2005) Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. **Exp.Physiol** 90:5, 663-670.
154. PIKE C. J., CUMMINGS B. J., COTMAN C. W. (1992) beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology. **Neuroreport** 3:9, 769-772.

155. PIROLA L., JOHNSTON A. M., VAN O. E. (2004) Modulation of insulin action. **Diabetologia** 47:2, 170-184.
156. PLUM L., SCHUBERT M., BRUNING J. C. (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends Endocrinol.Metab** 16:2, 59-65.
157. PRENTKI M., TORNHEIM K., CORKEY B. E. (1997) Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. **Diabetologia** 40 Suppl 2, S32-S41.
158. RAVICHANDRAN L. V., ESPOSITO D. L., CHEN J., QUON M. J. (2001) Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. **J.Biol.Chem.** 276:5, 3543-3549.
159. ROBERSON E. D. e MUCKE L. (2006) 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. **Science** 314:5800, 781-784.
160. RODGERS E. E. e THEIBERT A. B. (2002) Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. **Int.J.Dev.Neurosci.** 20:3-5, 187-197.
161. ROSELLI F., TIRARD M., LU J., HUTZLER P., LAMBERTI P., LIVREA P., MORABITO M., ALMEIDA O. F. (2005) Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. **J.Neurosci.** 25:48, 11061-11070.
162. ROSSNER S., LANGE-DOHNA C., ZEITSCHER U., PEREZ-POLO J. R. (2005) Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. **J.Neurochem.** 92:2, 226-234.
163. ROWAN M. J., KLYUBIN I., WANG Q., HU N. W., ANWYL R. (2007) Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction. **Biochem.Soc.Trans.** 35:Pt 5, 1219-1223.
164. SAGHIZADEH M., ONG J. M., GARVEY W. T., HENRY R. R., KERN P. A. (1996) The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. **J.Clin.Invest** 97:4, 1111-1116.

165. SALTIEL A. R. e KAHN C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature** 414:6865, 799-806.
166. SCHECHTER R., WHITMIRE J., WHEET G. S., BEJU D., JACKSON K. W., HARLOW R., GAVIN J. R., III. (1994) Immunohistochemical and in situ hybridization study of an insulin-like substance in fetal neuron cell cultures. **Brain Res.** 636:1, 9-27.
167. SCHEFF S. W. e PRICE D. A. (2003) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. **Neurobiol.Aging** 24:8, 1029-1046.
168. SCHEIBEL M. E., LINDSAY R. D., TOMIYASU U., SCHEIBEL A. B. (1975) Progressive dendritic changes in aging human cortex. **Exp.Neurol.** 47:3, 392-403.
169. SCHROER T. A. (2004) Dynactin. **Annu.Rev.Cell Dev.Biol.** 20, 759-779.
170. SELKOE D. J. (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. **Ann.Intern.Med.** 140:8, 627-638.
171. SELKOE D. J., YAMAZAKI T., CITRON M., PODLISNY M. B., KOO E. H., TEPLow D. B., HAASS C. (1996) The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** 777, 57-64.
172. SESHADRI S., BEISER A., KELLY-HAYES M., KASE C. S., AU R., KANNEL W. B., WOLF P. A. (2006) The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. **Stroke** 37:2, 345-350.
173. SETH P. e KOUL N. (2008) Astrocyte, the star avatar: redefined. **J.Biosci.** 33:3, 405-421.
174. SHEPHERD P. R., NAVE B. T., SIDDLE K. (1995) Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. **Biochem.J.** 305 (Pt 1), 25-28.
175. SHIM K. S. e LUBEC G. (2002) Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. **Neurosci.Lett.** 324:3, 209-212.

176. SHOELSON S. E., LEE J., GOLDFINE A. B. (2006) Inflammation and insulin resistance. **J.Clin.Invest** 116:7, 1793-1801.
177. SONG J., WU L., CHEN Z., KOHANSKI R. A., PICK L. (2003) Axons guided by insulin receptor in *Drosophila* visual system. **Science** 300:5618, 502-505.
178. SPIRES T. L., MEYER-LUEHMANN M., STERN E. A., MCLEAN P. J., SKOCH J., NGUYEN P. T., BACSKAI B. J., HYMAN B. T. (2005) Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. **J.Neurosci.** 25:31, 7278-7287.
179. STAMER K., VOGEL R., THIES E., MANDELKOW E., MANDELKOW E. M. (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. **J.Cell Biol.** 156:6, 1051-1063.
180. STANTON P. K. (1996) LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. **Hippocampus** 6:1, 35-42.
181. STEEN E., TERRY B. M., RIVERA E. J., CANNON J. L., NEELY T. R., TAVARES R., XU X. J., WANDS J. R., DE LA MONTE S. M. (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **J.Alzheimers.Dis.** 7:1, 63-80.
182. STELLWAGEN D., BEATTIE E. C., SEO J. Y., MALENKA R. C. (2005) Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. **J.Neurosci.** 25:12, 3219-3228.
183. STELLWAGEN D. e MALENKA R. C. (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. **Nature** 440:7087, 1054-1059.
184. STOKIN G. B. e GOLDSTEIN L. S. (2006) Axonal transport and Alzheimer's disease. **Annu.Rev.Biochem.** 75, 607-627.
185. STOKIN G. B., LILLO C., FALZONE T. L., BRUSCH R. G., ROCKENSTEIN E., MOUNT S. L., RAMAN R., DAVIES P., MASLIAH E., WILLIAMS D. S., GOLDSTEIN L. S. (2005) Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Science** 307:5713, 1282-1288.

186. STOLK R. P., BRETELER M. M., OTT A., POLS H. A., LAMBERTS S. W., GROBBEE D. E., HOFMAN A. (1997) Insulin and cognitive function in an elderly population. The Rotterdam Study. **Diabetes Care** 20:5, 792-795.
187. STOLL G. e JANDER S. (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Prog.Neurobiol.** 58:3, 233-247.
188. STREIT W. J., CONDE J. R., FENDRICK S. E., FLANARY B. E., MARIANI C. L. (2005) Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurol.Res.** 27:7, 685-691.
189. STREIT W. J. e KINCAID-COLTON C. A. (1995) The brain's immune system. **Sci.Am.** 273:5, 54-61.
190. TAGUCHI A. e WHITE M. F. (2008) Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. **Annu.Rev.Physiol** 70, 191-212.
191. TANAKA M., SAWADA M., YOSHIDA S., HANAOKA F., MARUNOUCHI T. (1995) Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice cultures. **Neurosci.Lett.** 199:1, 37-40.
192. TANCREDI V., D'ARCANGELO G., GRASSI F., TARRONI P., PALMIERI G., SANTONI A., EUSEBI F. (1992) Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. **Neurosci.Lett.** 146:2, 176-178.
193. TANG P., HUNG M.-C., KLOSTERGAARD J. (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. **Biochemistry** 35:25, 8216-8225.
194. TARKOWSKI E., ANDREASEN N., TARKOWSKI A., BLENNOW K. (2003) Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. **J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry** 74:9, 1200-1205.
195. TARKOWSKI E., BLENNOW K., WALLIN A., TARKOWSKI A. (1999) Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. **J.Clin.Immunol.** 19:4, 223-230.
196. TERRY R. D. (1996) The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. **J.Neuropathol.Exp.Neurol.** 55:10, 1023-1025.

197. THORENS B. (1992) Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 89:18, 8641-8645.
198. TOBINICK E. (2007) Perispinal etanercept for treatment of Alzheimer's disease. **Curr.Alzheimer Res.** 4:5, 550-552.
199. TOBINICK E. L. e GROSS H. (2008a) Rapid cognitive improvement in Alzheimer's disease following perispinal etanercept administration. **J.Neuroinflammation.** 5, 2.
200. TOBINICK E. L. e GROSS H. (2008b) Rapid improvement in verbal fluency and aphasia following perispinal etanercept in Alzheimer's disease. **BMC.Neurol.** 8, 27.
201. TOWNSEND M., MEHTA T., SELKOE D. J. (2007) Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. **J.Biol.Chem.** 282:46, 33305-33312.
202. TROJANOWSKI J. Q., SMITH A. B., HURYN D., LEE V. M. (2005) Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. **Expert.Opin.Pharmacother.** 6:5, 683-686.
203. TRUMPER K., TRUMPER A., TRUSHEIM H., ARNOLD R., GOKE B., HORSCH D. (2000) Integrative mitogenic role of protein kinase B/Akt in beta-cells. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** 921, 242-250.
204. TRUSHINA E., DYER R. B., BADGER J. D., URE D., EIDE L., TRAN D. D., VRIEZE B. T., LEGENDRE-GUILLEMIN V., MCPHERSON P. S., MANDAVILLI B. S., VAN H. B., ZEITLIN S., MCNIVEN M., AEBERSOLD R., HAYDEN M., PARISI J. E., SEEBERG E., DRAGATIS I., DOYLE K., BENDER A., CHACKO C., MCMURRAY C. T. (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. **Mol.Cell Biol.** 24:18, 8195-8209.
205. UCHIDA A., TASHIRO T., KOMIYA Y., YORIFUJI H., KISHIMOTO T., HISANAGA S. (2004) Morphological and biochemical changes of neurofilaments in aged rat sciatic nerve axons. **J.Neurochem.** 88:3, 735-745.

206. UCHIDA T., MYERS M. G., Jr., WHITE M. F. (2000) IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. **Mol.Cell Biol.** 20:1, 126-138.
207. ULLRICH A., BELL J. R., CHEN E. Y., HERRERA R., PETRUZZELLI L. M., DULL T. J., GRAY A., COUSSENS L., LIAO Y. C., TSUBOKAWA M., . (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. **Nature** 313:6005, 756-761.
208. UYSAL K. T., WIESBROCK S. M., MARINO M. W., HOTAMISLIGIL G. S. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature** 389:6651, 610-614.
209. VALENCIANO A. I., CORROCHANO S., DE P. F., DE I., V, DE LA ROSA E. J. (2006) Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. **J.Neurochem.** 99:2, 524-536.
210. VAN DER HEIDE L. P., RAMAKERS G. M., SMIDT M. P. (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. **Prog.Neurobiol.** 79:4, 205-221.
211. VAN G. T. e KADISH I. (2005) Transgenic AD model mice, effects of potential anti-AD treatments on inflammation and pathology. **Brain Res.Brain Res.Rev.** 48:2, 370-378.
212. VENTRE J., DOEBBER T., WU M., MACNAUL K., STEVENS K., PASPARAKIS M., KOLLIAS G., MOLLER D. E. (1997) Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. **Diabetes** 46:9, 1526-1531.
213. VRANG N., HANSEN M., LARSEN P. J., TANG-CHRISTENSEN M. (2007) Characterization of brainstem preproglucagon projections to the paraventricular and dorsomedial hypothalamic nuclei. **Brain Res.** 1149, 118-126.
214. WAJANT H., PFIZENMAIER K., SCHEURICH P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death.Differ.** 10:1, 45-65.

215. WALLACH D., ENGELMANN H., NOPHAR Y., ADERKA D., KEMPER O., HORNİK V., HOLTSMANN H., BRAKEBUSCH C. (1991) Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. **Agents Actions Suppl** 35, 51-57.
216. WALSH D. M., KLYUBIN I., FADEEVA J. V., CULLEN W. K., ANWYL R., WOLFE M. S., ROWAN M. J., SELKOE D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature** 416:6880, 535-539.
217. WALSH D. M. e SELKOE D. J. (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron** 44:1, 181-193.
218. WAN Q., XIONG Z. G., MAN H. Y., ACKERLEY C. A., BRAUNTON J., LU W. Y., BECKER L. E., MACDONALD J. F., WANG Y. T. (1997) Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. **Nature** 388:6643, 686-690.
219. WANG Q., ROWAN M. J., ANWYL R. (2004) Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. **J.Neurosci.** 24:27, 6049-6056.
220. WANG Q., WU J., ROWAN M. J., ANWYL R. (2005) Beta-amyloid inhibition of long-term potentiation is mediated via tumor necrosis factor. **Eur.J.Neurosci.** 22:11, 2827-2832.
221. WANG Y. T. e SALTER M. W. (1994) Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. **Nature** 369:6477, 233-235.
222. WELLEN K. E. e HOTAMISLIGIL G. S. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. **J.Clin.Invest** 115:5, 1111-1119.
223. WHITE J. A., MANELLI A. M., HOLMBERG K. H., VAN ELDIK L. J., LADU M. J. (2005) Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. **Neurobiol.Dis.** 18:3, 459-465.
224. WHITE M. F. (2002) IRS proteins and the common path to diabetes. **Am.J.Physiol Endocrinol.Metab** 283:3, E413-E422.

225. WHITE M. F. (2003) Insulin signaling in health and disease. **Science** 302:5651, 1710-1711.
226. WHITE M. F. e YENUSH L. (1998) The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. **Curr.Top.Microbiol.Immunol.** 228, 179-208.
227. WOODS S. C., SEELEY R. J., BASKIN D. G., SCHWARTZ M. W. (2003) Insulin and the blood-brain barrier. **Curr.Pharm.Des** 9:10, 795-800.
228. WYSS-CORAY T., LOIKE J. D., BRIONNE T. C., LU E., ANANKOV R., YAN F., SILVERSTEIN S. C., HUSEMANN J. (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. **Nat.Med.** 9:4, 453-457.
229. YAN Q., ZHANG J., LIU H., BABU-KHAN S., VASSAR R., BIERE A. L., CITRON M., LANDRETH G. (2003) Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. **J.Neurosci.** 23:20, 7504-7509.
230. YU C., CHEN Y., CLINE G. W., ZHANG D., ZONG H., WANG Y., BERGERON R., KIM J. K., CUSHMAN S. W., COONEY G. J., ATCHESON B., WHITE M. F., KRAEGEN E. W., SHULMAN G. I. (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **J.Biol.Chem.** 277:52, 50230-50236.
231. ZHAO W., CHEN H., XU H., MOORE E., MEIRI N., QUON M. J., ALKON D. L. (1999) Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. **J.Biol.Chem.** 274:49, 34893-34902.
232. ZHAO W. Q., CHEN H., QUON M. J., ALKON D. L. (2004) Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. **Eur.J.Pharmacol.** 490:1-3, 71-81.
233. ZHAO W. Q., DE FELICE F. G., FERNANDEZ S., CHEN H., LAMBERT M. P., QUON M. J., KRAFFT G. A., KLEIN W. L. (2008) Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. **FASEB J.** 22:1, 246-260.

234. ZICK Y. (2001) Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. **Trends Cell Biol.** 11:11, 437-441.

CURRICULUM VITAE

Nome: Theresa Rachel Jacinto de Souza Bomfim

Nascimento: 16/06/1982

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica

Faculdade de Fisioterapia – Universidade Estácio de Sá, Niterói, Julho de 2001 a Dezembro de 2005.

Comunicação em Congresso

13 comunicações em congressos nacionais

2 comunicações em congressos internacionais

Publicações

De Felice, F. G. ; Vieira, M. N. N. ; **Bomfim, T. R.** ; Decker, H. ; Velasco, P. T. ; Lambert, M. P. ; Viola, K. L. ; Zhao, W.-Q. ; Ferreira, S. T. ; Klein, W. L.. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A β oligomers. PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America p. 1971, 2009.

Paula-Lima, Andréa C. ; Tricerri, M. Alejandra ; Brito-Moreira, Jordano ; **Bomfim, TR** ; Oliveira, Fabio F. ; Magdesian, Margaret H. ; Grinberg, Lea T.; Panizzutti, Rogerio ; Ferreira, Sérgio T. . Human apolipoprotein A I binds amyloid- β and prevents A β -induced neurotoxicity. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 41, p. 1361-1370, 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)