

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Fernanda Tibolla Viero

**PAPEL DO RECEPTOR B2 DE CININAS NA PATOGÊNESE E PROGRESSÃO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL: DA RESPOSTA IMUNE À  
COGNIÇÃO**

Santa Maria, RS  
2019

**Fernanda Tibolla Viero**

**PAPEL DO RECEPTOR B2 DE CININAS NA PATOGÊNESE E PROGRESSÃO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL: DA RESPOSTA IMUNE À  
COGNIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, RS

2019

Viero, Fernanda Tibolla

PAPÉL DO RECEPTOR B2 DE CININAS NA PATOGÊNESE E  
PROGRESSÃO DA DOENÇA DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL: DA  
RESPOSTA IMUNE À COGNIÇÃO / Fernanda Tibolla Viero.-  
2019.

75 p.; 30 cm

Orientadora: Micheli Mainardi Pillat

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2019

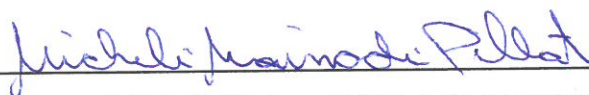
1. Receptor B2 de cininas 2. Camundongos nocaute 3.  
Camundongos APPswe/PS1dE9 4. Aetilcolinesterase. 5.  
Barreira Hematoencefálica I. Mainardi Pillat, Micheli  
II. Título.

**Fernanda Tibolla Viero**

**PAPEL DO RECEPTOR B2 DE CININAS NA PATOGÊNESE E PROGRESSÃO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL: DA RESPOSTA IMUNE À  
COGNIÇÃO**

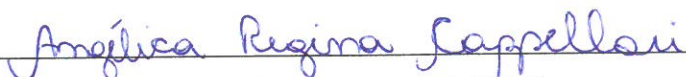
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**

**Aprovada em 02 de agosto de 2019.**

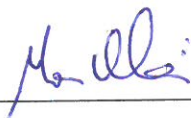


**Micheli Mainardi Pillat, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

Presidente (Orientadora)



**Angélica Regina Cappellari, Dr<sup>a</sup> (PUC)**



**Mauro Schneider Oliveira, Dr (UFSM)**

Santa Maria, RS

2019

Aos meus pais, que tanto amo.

## AGRADECIMENTOS

Encontrando-me na reta final de mais uma etapa importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta caminhada e contribuíram para a realização desta dissertação.

Primeiramente à Deus pela sua magnitude, pela construção do Universo e a minha, por me ajudar ter resiliência, me proteger e guiar meus passos por onde quer que eu vá.

Aos meus queridos Pais, Jair e Alaíde, pelo amor incondicional, pela inspiração de cada dia, por todos os sacrifícios e privações pelos quais passaram para permitir que eu pudesse estudar e morar em outro estado, por todas as ligações de encorajamento, todos os abraços, palavras de carinho e direcionamentos. Não há palavras para descrever minha eterna gratidão por todo apoio que sempre me deram. Amo-os mais que tudo!

À professora Dra. Micheli Mainardi Pillat, por toda confiança, ensinamentos, conselhos. Por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte da sua pesquisa, pela orientação, amizade e paciência.

Ao professor Dr. Carlos Mello, por ter me acolhido no LABNEURO, pela orientação e sabedoria.

Aos animais que doaram suas vidas pela ciência.

Ao meu namorado, Giovane, que sempre me apoiou nessa jornada.

As minhas colegas Mariana Godoy e Grasielle da UFRJ pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos, Juliana Oliveira, Gabriele, Eduardo, Felipe e Juliana Silveira. Obrigada!

À CAPES pelo financiamento desse projeto.

*“What is perhaps the most intriguing question of all is whether the brain is powerful enough to solve the problem of its own creation”. (Gregor Eichele, 1992)*

*“Human truths, however valuable they seem, are always open to challenge, revision, to refinement, to refutation, to repeal. Only the question is eternal.” (Andre Geurard)*

## RESUMO

# PAPEL DO RECEPTOR B2 DE CININAS NA PATOGÊNESE E PROGRESSÃO DA DOENÇA DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL: DA RESPOSTA IMUNE À COGNIÇÃO

AUTORA: Fernanda Tibolla Viero  
ORIENTADORA: Micheli Mainardi Pillat

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa complexa e progressiva caracterizada pelo declínio e perda das funções cognitivas, sendo a mais comum das demências. As principais características histopatológicas da DA são a presença de placas amilóides, compostas por agregados do peptídeo beta-amilóide ( $\beta$ A) e emaranhados neurofibrilares (ENFs) formados principalmente por proteínas tau hiperfosforiladas. Em meio a vários fatores que estão envolvidos na patogênese e progressão da DA, a neuroinflamação é um processo inerente à patogênese da doença de Alzheimer (DA). Estudos demonstram que o sistema de cininas é estimulado pelo peptídeo patológico  $\beta$ A em pacientes com DA. Os efeitos desse sistema são mediados principalmente pela bradicinina (BK) e seu receptor B2 de cininas (B2R) e compreendem a ação direta na permeabilização da barreira hematoencefálica (BHE) e na inflamação. Assim, investigamos os possíveis efeitos do bloqueio do B2R em diferentes modelos de DA: camundongos machos (n= 6 a 8) duplos transgênicos como modelo da DA familiar (APPswe / PS1dE9) e injeções de peptídeo  $\beta$ A oligomérico em machos C57BL6 (n=10), ambos expressando ou não B2R ou pré-tratados com antagonista de B2R: HOE-140. Atividade da acetilcolinesterase e a permeabilidade da BHE foram verificados após injeção com oligômero de  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ Os). Adicionalmente, testes de reconhecimento de objeto foram realizados em animais de 3, 6 e 9 meses para o genótipo APPswe/PS1dE9 e 48 horas e 7 dias em animais injetados com A $\beta$ Os. Os dados obtidos mostram a primeira evidência de que os A $\beta$ Os aumentaram a permeabilidade da BHE e o HOE-140 proporciona proteção significativa contra o efeito dos A $\beta$ Os. Similarmente, o antagonista de B2R reduziu a atividade da acetilcolinesterase (AChE), sugerindo que a modulação de B2R pode atuar como uma nova estratégia terapêutica para a DA, já usada na clínica para tratar o angioedema hereditário. Curiosamente, tanto HOE-140 quanto o knockout genético de B2R (B2R<sup>-/-</sup>) impediram o declínio da memória de longo prazo nos camundongos modelos da DA. Coletivamente, estes resultados sugerem que o bloqueio de B2R pode ser um alvo de tratamento profilático na desaceleração da neurodegeneração.

**Palavras-chave:** Receptor B2 de cininas; Camundongos nocaute; camundongos APPswe/PS1dE9; acetilcolinesterase.



## ABSTRACT

### ROLE OF KININ RECEPTOR B2 IN THE PATHOGENESIS AND PROGRESSION OF EXPERIMENTAL ALZHEIMER DISEASE: FROM IMMUNITY RESPONSE TO COGNITION

AUTHOR: Fernanda Tibolla Viero

ADVISOR: Micheli Mainardi Pillat

Alzheimer's disease (AD) is a complex and progressive neurodegenerative disorder characterized by the decline and loss of cognitive functions, and it is the most common of dementias. The major pathological features of AD are the presence of amyloid plaques which consist of aggregates of amyloid beta peptide ( $A\beta$ ) and neurofibrillary tangles formed mainly by hyperphosphorylated tau proteins. Among several factors that are involved in the pathogenesis and progression of AD, neuroinflammation is an inherent process in the pathogenesis of AD. Studies show that the kinin system is stimulated by the pathological  $A\beta$  in AD patients. The effects of this system are mainly mediated by bradykinin (BK) and its kinin-B2 receptor (B2R) and include the direct action of blood-brain barrier (BBB) permeabilization and inflammation. Thus, we investigated the possible effects of B2R blockade on different AD models: double transgenic male mice ( $n = 6$  to  $8$ ) as a family AD model (APP<sup>swe</sup> / PS1<sup>dE9</sup>) and oligomeric  $A\beta$  peptide injections in C57BL6 males ( $n = 10$ ), expressing B2R or not and pretreated with saline or B2R antagonist: HOE-140. Acetylcholinesterase levels and BBB permeability were verified after injection with  $\beta$ -amyloid oligomer ( $A\beta$ OS). In addition, object recognition testing was performed on animals aged 3, 6 and 9 months for APP<sup>swe</sup> / PS1<sup>dE9</sup> genotype and 48 hours and 7 days on animals injected with  $A\beta$ OS. The data obtained show the first evidence that  $A\beta$ OS increased BHE permeability and HOE-140 provided significant protection against  $A\beta$ OS effect. Similarly, the B2R antagonist reduced acetylcholinesterase (AChE) activity, suggesting that B2R modulation may act as a new therapeutic strategy for AD, already used clinically to treat hereditary angioedema. Interestingly, both HOE-140 and B2R knockout (B2R<sup>-/-</sup>) prevented long-term memory decline in AD models. Collectively, these results suggest that B2R blockade may be a target of prophylactic treatment in neurodegeneration deceleration.

**Keywords:** kinin-B2 receptor; Knockout mice; APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice; acetylcholinesterase.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1- Processamento amiloidogênico APP</b> .....	19
<b>Figura 2- Sistema de Cininas</b> .....	29
<b>Figure 1.</b> Genotyping of B2R knockout mice and Transgenic (Tg) APP <sup>swe</sup> PS1 <sup>dE9</sup> (APP/PS1), model of familial Alzheimer's disease.....	46
<b>Figure 2.</b> Detection of fluorescence emitted by fluorescein in the brain of animals.....	47
<b>Figure 3.</b> Analysis of activity levels of the acetylcholinesterase enzyme.....	48
<b>Figure 4.</b> Object Recognition Tests (OR) to observe possible cognitive deficits...	49
<b>Figure 5.</b> Cognitive deficit induced by A $\beta$ oligomers is suppressed in animals treated with HOE-140 (B2R antagonist).....	50
<b>Figura 1.1:</b> Representação do Teste de Campo Aberto .....	73
<b>Figura 1.2.</b> Análise da Atividade Locomotora em animais modelo da DA tipo familiar.....	74
<b>Figura 1.3:</b> Avaliação de parâmetros de Ansiedade em aparato de Campo Aberto	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Enzima acetilcolinesterase
<b>AChEI</b>	Inibidor da acetilcolinesterase
<b>ADDLs</b>	<i>A<math>\beta</math> derived diffusible ligands</i>
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios Não-Esteroides
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ApoE</b>	Apolipoproteína E
<b>APP</b>	Proteína Percursora de Amiloide
<b>A<math>\beta</math></b>	Proteína $\beta$ -amiloide
<b>A<math>\beta</math>OS</b>	Oligômero de $\beta$ -amiloide
<b>BHE</b>	Barreira Hematoencefálica
<b>B2R</b>	Receptor B2
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>ENFs</b>	Emaranhados Neurofibrilares
<b>eNOS</b>	Óxido Nítrico Sintetase endotelial
<b>ERK</b>	Quinase regulada por sinal extracelular
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FXII</b>	Fator de contato XII
<b>Gq</b>	Proteína G acoplada a fosfolipase C
<b>Gi</b>	Proteína G inibitória
<b>I.C.V</b>	Intracerebroventricular
<b>IP</b>	Inositolfosfato
<b>IRSS</b>	Inibidores seletivos de recaptura de serotonina
<b>ISRSN</b>	Inibidores seletivos de recaptura de serotonina e dopamina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>HOE-140</b>	Antagonista para o B2R
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquidiano
<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por Mitógeno
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato

<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>PET-Pib</b>	Tomografia de emissão de positron com composto de <i>Pittsburgh</i>
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PS1 e 2</b>	Presenilina 1 e 2
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>Th1</b>	Tipo T Helper
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator $\alpha$ de necrose tumoral
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator beta de crescimento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 HIPÓTESE.....	16
1.2 OBJETIVOS .....	16
<b>1.2.1 Objetivo Geral</b> .....	16
<b>1.2.2 Objetivos Específicos</b> .....	17
1.3 JUSTIFICATIVA.....	17
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	18
2.2 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS.....	20
2.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	23
2.4 MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA DA .....	25
2.5 BRADICININA.....	28
2.6 BRADICININA E DA.....	30
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	32
3.1 INTRODUCTION.....	33
3.2 MATERIALS AND METHODS .....	34
<b>3.2.1 Animals</b> .....	34
<b>3.2.2 Pharmacological treatment</b> .....	34
<b>3.2.3 Mouse genotyping</b> .....	35
<b>3.2.4 AβOs</b> .....	35
<b>3.2.5 Brain infusions in mice</b> .....	35
<b>3.2.6 Blood-Brain Barrier (BBB) permeability</b> .....	35
<b>3.2.6 Determination of acetylcholinesterase activity in the brain</b> .....	36
<b>3.2.7 Behavioural testing</b> .....	36
<b>3.2.8 Statistical analysis</b> .....	37
3.3 RESULTS.....	37
<b>3.3.1 Establishment by crosses and genotypes of the colony of B2R<sup>-/-</sup> knockout mice containing the mutations for familial AD (APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9+/-</sup> B2R<sup>-/-</sup>)</b> .....	37
<b>3.3.2 Studies on the integrity of the blood-brain barrier (BBB) in AD model animals (AβOs) following B2R pharmacological inhibition</b> .....	38
<b>3.3.3 Analysis of the activity levels of the enzyme acetylcholinesterase</b> .....	38

<b>3.3.4 Behavioral analyzes of wild mice and AD models (APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> and i.c.v. injection of A<math>\beta</math>Os), knockout or not for B2R.....</b>	<b>39</b>
3.4 DISCUSSION.....	40
<b>REFERENCES.....</b>	<b>42</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>73</b>

## **APRESENTAÇÃO**

O trabalho será organizado da seguinte forma: primeiramente são apresentados INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. As seções MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS encontram-se no artigo submetido no periódico *Brain, Behavior and Immunity* e representam a íntegra deste trabalho. Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÕES encontrados no final desta dissertação apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho. O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS refere-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO desta dissertação.

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da longevidade da população mundial teve como consequência uma maior incidência de doenças neurodegenerativas, dentre as quais se destaca a doença de Alzheimer (DA), responsável por aproximadamente 80% de todos os diagnósticos de demência (CROUSBOU et al., 2017). No Brasil, a estimativa é que a DA acometa até 1,1 milhão de pessoas (BRASIL, 2010) sendo portanto, de interesse para a saúde pública (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

A DA caracteriza-se por ser um distúrbio heterogêneo e complexo, no qual fenômenos genéticos e ambientais podem estar em cooperação para à disfunção cerebrovascular (CACABELOS, 2008), depósitos de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), hiperfosforilação da tau e emaranhados neurofibrilares (ENFs), os quais são características da DA (BRAAK; BRAAK, 1991). Além disso, foi demonstrado diminuição da concentração de acetilcolinesterase (AChE) no cérebro de pacientes com DA, sendo sugerido tal fato estar em associação as placas amilóides e a ENFs (ULRICH et al., 1990).

Em meio a vários fatores que estão envolvidos na patogênese e progressão da DA, a neuroinflamação merece destaque e, portanto, sinais que a promovam podem apoiar ou atuar como gatilhos para a instauração da patologia (ROJO et al., 2008). Nesse sentido, o sistema de cininas é intimamente relacionado com respostas imunes, já que é (i) um potente mediador da inflamação, (ii) favorecendo a polarização de linfócitos para o perfil Th1 e (iii) aumento a permeabilização da barreira hematoencefálica (BHE). Interessantemente, Zamolodchikov et al., (2015) Ashby, Love e Kehoe (2012) demonstraram que a cascata proteolítica das cininas, a começar pelo fator de contato XII (FXII), está excessivamente ativada tanto nos modelos murinos quanto em pacientes com a DA. De fato, pacientes com tal demência apresentam alta atividade da calicreína plasmática (enzima que cliva o cininogênio em bradicinina) no parênquima cerebral (ASHBY; LOVE; KEHOE, 2012) e o FXII está associado às placas de  $A\beta$ , observado no cérebro pós-morte (YASUHARA; WALKER; MCGEER, 1994). Ainda, a estimulação do sistema de cininas se inicia com o FXII, sendo diretamente ativado pelo  $\beta A$ , visto que esse último apresenta carga negativa (BERGAMASCHINI et al., 2001; ZAMOLODCHIKOV et al., 2015).

Os efeitos do sistema de cininas são mediados, principalmente, pela bradicinina (BK) e seu receptor B2 (B2R). Em cérebros *post mortem* de indivíduos com a DA observou-se uma expressão aumentada de B2R no córtex e no hipocampo, região responsável pelo processamento da memória e o primeiro domínio cognitivo afetado pela DA (YASUHARA;



WALKER; MCGEER, 1994). Entretanto, o papel da sinalização BK/B2R nos processos inerentes da patogênese e na progressão da DA são desconhecidos. Adicionalmente, não existem alternativas terapêuticas eficazes para impedir a progressão da DA, cuja incidência tende a aumentar proporcionalmente à expectativa de vida da população mundial. Assim, buscamos entender o papel do B2R e seus mecanismos a jusante envolvidos na inflamação neural e déficit de memória em dois modelos experimentais da DA [camundongos transgênicos APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> que super expressam a mutação sueca de APP em conjunto com PS1 suprimido no éxon 9, o qual tem sido amplamente utilizado na pesquisa de AD familiar (BORCHELT et al., 1997; JANKOWSKY et al., 2001) e injeção i.c.v de A $\beta$ ]. Para evidenciar o papel do B2R nesta patologia, tratamos os camundongos com o fármaco antagonista do B2R HOE-140 (atualmente empregado no tratamento de angioedema hereditário) e utilizamos camundongos knockout para o B2R, afim de avaliar possíveis diferenças entre os modelos experimentais e esclarecer as alterações neurobiológicas envolvidas tanto na patogênese, quanto na progressão da DA.

## 1.1 HIPÓTESE

BK atua como uma molécula chave nos processos observados na DA, via receptor B2. Sendo assim, em ambos modelos experimentais, tanto animais knockout para o B2R contendo mutações para a DA familiar (APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9+/-</sup> B2R<sup>-/-</sup>) quanto em animais injetados com oligômero de A $\beta$  (A $\beta$ OS) e HOE-140, apresentam melhora de parâmetros como: permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), atividade da AchE e cognição em comparação aos animais com genótipo APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9+/-</sup> B2R<sup>+/+</sup> ou animais somente injetados com oligômero de A $\beta$ , sem antagonista de B2R.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da sinalização BK/B2R, bem como seus mecanismos a jusante, em processos inerentes da patogênese e na progressão da doença de Alzheimer experimental em modelo animal.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecimento de camundongos transgênicos *knockout* para o receptor B2 de cininas contendo as mutações para doença de Alzheimer familiar, APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9+/-</sup> B2R<sup>-/-</sup> (cruzamentos e genotipagens).

Em camundongos com 3 e 6 meses de vida, separados nos grupos de estudo:

- 1) Selvagem (WT)
- 2) B2R<sup>-/-</sup>
- 3) APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>
- 4) APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>/B2R<sup>-/-</sup>
- 5) Vh - injeção de oligômeros de A $\beta$  (A $\beta$ OS)
- 6) Vh-HOE 140
- 7) A $\beta$ OS/HOE 140
- 8) WT/Vh

- Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica pelo método de fluoresceína de sódio em 48 horas e 7 dias após a injeção de oligômero A $\beta$  ou Veículo (Vh) nos grupos: Selvagem, A $\beta$ OS, HOE-140 e A $\beta$ OS/HOE 140.
- Quantificar a atividade da enzima Acetilcolinesterase no encéfalo de animais, após injeção de oligômero de A $\beta$  ou Vh em 48 horas nos grupos: Selvagem, A $\beta$ OS, HOE-140 e A $\beta$ OS/HOE 140.
- Estimar o déficit cognitivo de todos os animais abrangentes dos grupos descritos acima.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

Considerando a DA uma doença neurodegenerativa que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e sua incidência tendendo a aumentar em igual proporção ao aumento da expectativa de vida da população, é iminente a preocupação quanto às alternativas terapêuticas eficazes para esta doença (JAKUBS et al. 2008). Descobertas de terapias eficientes que impeçam ou retardem a patogênese da DA são especialmente importantes para indivíduos portadores de mutações específicas (geralmente nos genes da APP e PS1) que originam a DA do tipo familiar, pelo fato de que estes indivíduos poderiam recorrer a intervenções terapêuticas antes que essa possa se instaurar. Portanto, vias capazes de desencadear processos relacionados a DA, ou se a eliminação dessas vias poderia prevenir ou retardar o início da patogênese e, tão

logo, o declínio cognitivo, são de especial interesse, tanto no entendimento da patogênese da DA, assim como no desenvolvimento de intervenções terapêuticas.

Alguns estudos epidemiológicos sugeriram que os medicamentos anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) reduzem o risco de desenvolver a patologia. Entretanto, estudos clínicos randomizados, controlados por placebo, demonstram que estes medicamentos falham em estabilizar ou prevenir o início da demência (SZEKELY; ZANDI, 2012). Assim, outros componentes ou vias mediadoras da inflamação/resposta imune na DA, que não são alvos dos AINEs, precisam ser investigados almejando obter intervenções terapêuticas eficazes.

Em meio a estas circunstâncias, estudos independentes sobre os processos implicados na patogênese da DA e sobre os efeitos da sinalização BK/B2R em outras condições fisiopatológicas apresentam resultados similares e convergem no sentido de apontar a sinalização BK/B2R com importante papel mediador dos processos inerentes da patogênese dessa demência. Portanto, o B2R pode ter protagonismo na patogênese da DA e dessa forma, atuar como alvo promissor para futuras intervenções medicamentosas. Essa hipótese ganha ainda mais relevância tendo em vista que o sistema de cininas é estimulado pelo peptídeo  $\beta$ A e está excessivamente ativado em pacientes com a DA. (ASHBY, LOVE e KEHOE, 2012; BERGAMASCHINI et al. 2001). Entretanto, apesar de todas estas evidências, até os dias atuais pouco se sabe acerca da sinalização de BK/B2R na patogênese da DA.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

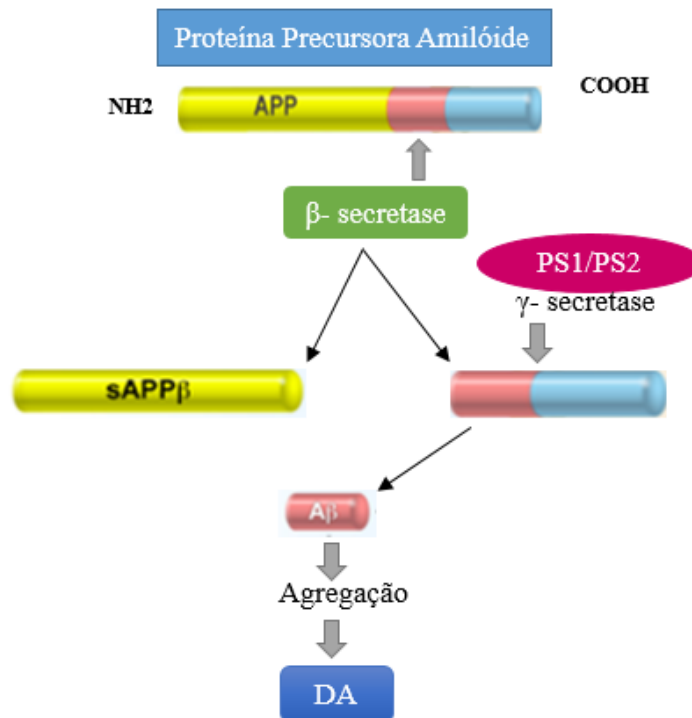
### **2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER**

Com mais de 35 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo, a DA é a forma mais incidente de demência (QUERFURTH; LAFERLA, 2010). No Brasil, igualmente, a prevalência da DA apresentou 55% dos casos que incluíam idosos com 65 anos de idade (HERRERA JR et al., 2002)

A DA é uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada pelo declínio e perda das funções cognitivas, que pode ser subdividida em: doença familiar, de início precoce ocasionada por mutações genéticas específicas, e doença esporádica, de início tardio. Os genes associados a DA familiar incluem três mutações autossômicas: proteína precursora amilóide (APP), presenilina 1 (PS1) ou presenilina 2 (PS2) (LIN; SCOTT, 2012). A APP é expressa em diversos tipos celulares e pode sofrer diferentes regulações pós-transcricionais e pós-traducionais de acordo com a sinalização celular (GRALLE; FERREIRA, 2007). Já, PS1 e PS2

são as subunidades catalíticas do complexo enzimático  $\gamma$  secretase. Este complexo cliva a APP no fragmento patogênico  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) em diferentes locais, gerando diferentes formas de  $A\beta$ , que diferem em seus tamanhos (39, 40, 42 ou 43). A forma mais abundante é a forma  $A\beta_{1-40}$ , mas  $A\beta_{1-42}$  é mais hidrofóbica e propensa à agregação, que levam eventualmente a formação de placas compostas de  $A\beta$  característica da DA (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

**Figura 1- Processamento amiloidogênico APP**



Fonte: LaFerla (2002) adaptado.

A relação entre DA e sua origem hereditária é complexa. Assim, em síntese, pode ser dividida de acordo com a idade em que os sintomas aparecem: início precoce e início tardio (CACABELOS, 1996). Embora sejam clinicamente indistinguíveis, a DA de início precoce tem o aparecimento dos sintomas clínicos antes dos 65 anos de idade, sendo caracterizada por um declínio acelerado das funções cognitivas. Esse tipo de DA corresponde a cerca de 10% e inclui número substancial de variantes fenotípicas que diferem da apresentação amnésica usual da DA típica (MENDEZ, 2019). Além disso, para Karch e Goate (2015) apenas cerca de 11% daqueles acometidos com DA de início precoce está associada a uma das mutações conhecidas: APP, PS1 e PS2. Nesse seguimento, estudos de rastreamento desses genes em pacientes com DA tipo familiar apontam prevalência de 0,8% para APP, 1,1% para PS1 e até 13% para potenciais

variantes da PS2, que podem ser manifestado mesmo após os 65 anos de idade. (BLAUWENDRAAT et al., 2016; NICOLAS et al., 2016).

Para Bekris e colaboradores (2010), pacientes com DA de início precoce, relacionada a um padrão de transmissão autossômica dominante ligada aos cromossomos 1, 14 e 21 não só têm um risco aumentado para o desenvolvimento de DA entre familiares, mas também podem apresentar características clínicas atípicas, incluindo mioclonia, convulsões, anormalidades da marcha e hiperreflexia. (GERRITSEN et al., 2016; SOLOMON; AUGUSTINE; YOON, 2010). Ainda, indivíduos com a Trissomia do cromossomo 21, característica de portadores da síndrome de Down, apresentam cópia adicional do gene APP, que é responsável pela produção adicional em 50% da proteína APP, conseqüentemente, aumentando a produção de  $\beta$ A e conduzindo a DA de início precoce (REITZ; MAYEUX, 2015).

Já a DA de início tardio ou de forma esporádica (90% dos pacientes), acomete pacientes acima dos 65 anos de idade e está associada a uma progressão mais lenta da patologia clínica. Ao contrário da DA familiar, a DA de forma esporádica não apresenta nenhuma mutação associada, descrita até este período. No entanto, estudos longitudinais de agregação familiar e estudos com gêmeos, apontam que mutações em alguns genes específicos constituem fatores de risco no desenvolvimento deste tipo de DA (REITZ; MAYEUX, 2015). Nesse sentido, destaca-se como potencial fator de risco genético polimorfismos no gene que codifica a apolipoproteína E (APOE). A APOE tem um importante papel no metabolismo, sendo responsável pelo transporte de lipoproteínas e colesterol no sangue, e é o principal transportador de colesterol do cérebro. A APOE tem três alelos comuns:  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4 (LIU; KANEKIYO; XU, 2013). Entretanto, somente a APOE  $\epsilon$ 4 está associada a um risco aumentado, cerca de 20 vezes maior de desenvolvimento de DA, reduzindo a idade média do início dos sintomas. (LIU; KANEKIYO; XU, 2013; NEU et al., 2017; REITZ; MAYEUX, 2015).

Adicionalmente, a APOE  $\epsilon$ 4 contribui para o risco de DA através de uma variedade de mecanismos, incluindo agregação aumentada de  $A\beta$ , aumento da fosforilação da tau; redução do metabolismo vascular e função mitocondrial. (LIU; KANEKIYO; XU, 2013). Morris et al., (2010) demonstraram através de imagenologia PET-PiB e de biomarcadores de  $A\beta$  no LCR, que qualquer indivíduo homocigótico para o alelo ApoE  $\epsilon$ 4, independentemente da faixa etária, apresenta níveis reduzidos de  $A\beta_{42}$  no LCR e elevada deposição de  $A\beta$  no parênquima cerebral. Ainda, estudos de interações entre todo o genoma identificaram muitas variantes genéticas comuns que modificam o risco de DA de início tardio. (CARMONA; HARDY; GUERREIRO, 2018). Tais genes convergem em vias biológicas envolvendo o metabolismo lipídico e imunidade inata. Além disso, constatou-se que os efeitos de cada gene quanto ao risco da

instauração da DA são pequenos e não clinicamente significativos. Nesse sentido, a genotipagem da APOE não é indicada na avaliação clínica de pacientes com suspeita de DA, uma vez que o alelo  $\epsilon 4$  não é um gene determinante e sim, um fator de risco. (KNOPMAN et al., 2001)

Além do fator de risco genético, estudos, apontam para desequilíbrio no metabolismo endócrino adquirido ao longo da vida como um importante fator que parece contribuir estabelecimento da DA tardia (DAVIGLUS et al., 2011; FELICE, 2013). Portanto, a etiologia da DA ainda não está totalmente clara, mas possivelmente é resultado de um conjunto de diversos fatores (ROBERSON E MUCKE, 2006).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

Através de exame macroscópico do encéfalo *post mortem*, há tipicamente, atrofia dos lobos temporais e do córtex cerebral. Quanto ao exame microscópico, evidencia-se perda sináptica e (em menor grau) neuronal. (CALDERON-GARCIDUEÑAS; DUYCKAERTS, 2018)

A hipótese da cascata amilóide propõe que alterações na proteína tau e formação dos ENFs são provocados por altas concentrações do peptídeo  $A\beta$  (ZHANG et al., 2011). Sendo assim, essas duas lesões patognomônicas da DA estabelece o diagnóstico neuropatológico da patologia. As placas senis correspondem a depósitos extracelulares compostos principalmente por peptídeos  $A\beta_{1-42}$  agregados. Já, os ENFs são constituídos por proteína tau hiperfosforilada anormalmente e possuem inclusões intracelulares que demarcam o corpo celular, podendo alterar a funcionalidade dos neurônios (BALLARD et al., 2011; D'SOUZA et al., 2002; HASEGAWA; SMITH; GOEDERT, 1998).

Para Kapogiannis e Mattson (2011) a anormalidade funcional dos neurônios, deve-se tanto aos axônios, quanto as sinapses serem seletivamente vulneráveis ao acúmulo intracelular de substratos patológicos, podendo assim, se iniciar um processo de morte celular. A distribuição dos ENFs aparece tipicamente, primeiro no córtex transentorinal e entorrinal (a fase pré-clínica da DA ou assintomática - estágios Braak I e II), seguido por regiões límbicas, conhecidas por um início insidioso de declínio da memória episódica e de outras capacidades cognitivas que, geralmente são despercebidos pelo doente, familiares e pessoas próximas. (KNOPMAN; BOEVE; PETERSEN, 2003). Nessa fase, a maioria dos doentes com DA passam por um estado de transição intermédio, que se situa entre o envelhecimento cognitivo normal e o estado de demência instalado. (estágios Braak III e IV) (BRAAK; BRAAK, 1991). Já, os

estágios Braak V e VI ou isocorticais o processo neuropatológico encontrar-se estabelecido, sendo o córtex entorrinal e o hipocampo bastante deteriorados (BRAAK; BRAAK, 1991). Nessa fase, há um comprometimento progressivo da linguagem, compreensão e fluência verbal. Nesse sentido, os sintomas cognitivos relacionados a DA se correlacionam mais fortemente com a carga e a distribuição dos ENFs do que com A $\beta$  (NELSON et al., 2012).

Ainda, resultados experimentais indicam que o acúmulo de  $\beta$ A precede a agregação da tau. Além disso, a degeneração induzida por A $\beta$  em culturas de neurônios juntamente com acentuada diminuição da atividade de Ach (ROY; DIXIT; SAXENA, 2008) confirmam o déficit cognitivo observado em camundongos com DA. (QUERFURTH; LAFERLA, 2010). As proteínas A $\beta$  e tau atuam adicionalmente, como padrões moleculares indutores de vias de sinalização inflamatórias e acabam levando à produção e liberação de mediadores inflamatórios, ativação de micróglia em fenótipo M1, astrócitos reativos, crescente produção de citocinas, quimiocinas, e espécies reativas de oxigênio (SOCHOCKA; DINIZ; LESZEK, 2017).

A ativação persistente dessas células do sistema imune inato, leva à resposta inflamatória crônica que desencadeia os processos neurotóxicos (neuroinflamação) relacionados a DA (HENEKA et al., 2015; SOCHOCKA; DINIZ; LESZEK, 2017). As micróglia, as primeiras células efetoras da neuroinflamação podem assumir diferentes fenótipos e estados de ativação, como: (i) estado de repouso; (ii) ativação M1 (que produz citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ); e (iii) ativação M2, (que produz citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  e se torna mais apta para realizar fagocitose, por exemplo, de A $\beta$ ). Estudos têm se referido a grande importância do estado M2 das micróglia na DA e os seus modelos murinos (HICKMAN; ALLISON; KHOURY, 2008; STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004). Igualmente, níveis elevados de TNF- $\alpha$  foram identificados no LCR e no cérebro de pacientes DA (TOBINICK, 2007), bem como em modelos de animais transgênicos para a doença (RUAN et al., 2009).

Vom Berg e colaboradores (2012) observaram que a progressão da patologia e o declínio cognitivo foram inibidos em camundongos knockout IL12<sup>-/-</sup>, sugerindo o papel chave da resposta imune celular mediada pelo infiltrado de linfócitos, nessa patologia. De fato, observou-se uma superexpressão das citocinas IL-12 e INF $\gamma$  e uma expressão diminuída de IL-4 no córtex de camundongos transgênicos APP<sup>Swe</sup> (ABBAS et al., 2002).

Além disso, o perfil M1 das micróglia ativa os astrócitos, outra importante célula glial que respalda o funcionamento dos neurônios. Em conjunto, como um passo sequencial da neuroinflamação e da patogênese de doenças neuroinflamatórias, essas células gliais podem

colaborar para a disfunção do sistema de proteção do SNC, a barreira hematoencefálica (BHE) e recrutar leucócitos do sangue (GÖBEL et al., 2019; LE PAGE et al., 2018; SALLUSTO; LARONI, 2012; SOCHOCKA; DINIZ; LESZEK, 2017).

A disfunção da BHE é uma fronteira relativamente nova na pesquisa da DA (MONTAGNE; ZHAO; ZLOKOVIC, 2017; NELSON et al., 2016; ZLOKOVIC, 2014). Em modelo animal para DA, além da disfunção da BHE, observa-se diminuição do fluxo sanguíneo cerebral na patogênese da DA (NIWA et al., 2002; ZLOKOVIC, 2008). Estas alterações poderiam facilitar a infiltração de células do sistema imune periférico, além de alterar o tráfico de A $\beta$  entre o sangue e o SNC (VOM BERG et al., 2012). Corroborando tal fato, estudos com pacientes e modelo animal da DA sugerem a ocorrência de células T ativadas infiltradas no SNC (TOGO et al., 2002; TOWN; NIKOLIC; TAN, 2005).

### 2.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Em pacientes com DA, além do acúmulo de A $\beta$  e ENFs, a concentração de acetilcolina (ACh) na transmissão de impulsos neuronais é acentuadamente reduzida (ROY; DIXIT; SAXENA, 2008). Igualmente, elevada atividade de AChE têm sido encontrados em amostras de cérebro *post-mortem* em pacientes acometidas por essa patologia (CHAIYANA; OKONOJI, 2012). Nesse sentido, buscando alternativas para tratar a DA, foi sugerida a hipótese do déficit colinérgico no prosencéfalo basal (CAMPS; MUNOZ-TORRERO, 2005). A terapia colinérgica, segue atualmente como uma das principais estratégias para o tratamento da DA. Entretanto, as terapias farmacológicas usuais estão restritas à melhoria parcial e transitória dos sintomas cognitivos (inibidores da acetilcolinesterase e memantina) e comportamentais (antidepressivos, antipsicóticos e ansiolíticos) (BIRKS, 2006; WONG, 2016).

Uma abordagem racional do tratamento medicamentoso para DA inclui os fármacos inibidores da acetilcolinesterase (AChEIs) na demência leve e a adição de memantina quando os pacientes entram no estágio moderado da doença (WONG, 2016). Aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) em 1993, os AChEIs aumentam a transmissão colinérgica, através do mecanismo de inibição das suas enzimas catalíticas (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), permitindo assim, a manutenção do gradiente de concentração da Ach durante os processos de transmissão sináptica e a capacidade da Ach estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (BECKER, 1985). Alguns AChEIs, além da função de inibição da AChE, possuem também ação neuroprotetora. Adicionalmente, estas drogas atuam



de forma negativa no processo de fosforilação da proteína A $\beta$ , inibindo a clivagem da APP e consequentemente a formação de placas amilóides (RACCHI et al., 2004; SAMADI et al., 2010).

Os principais AChEIs usadas na prática clínica são: rivastigmina, donepezil e galantamina (AISEN et al., 2012; ZHANG et al., 2009). A galantamina e o donepezil são inibidores reversíveis da AChE, de duração intermediária e longa, respectivamente. Por sua vez, a rivastigmina, é um inibidor pseudoirreversível (ou lentamente reversível), que tem duração intermédia. A rivastigmina, além da inibição da AChE, inibe também a butirilcolinesterase, o que pode culminar em maior incidência de efeitos colaterais. Por outro lado, a inibição de ambas enzimas catalíticas, pode representar benefícios adicionais ao tratamento, uma vez que a butirilcolinesterase também parece estar envolvida na maturação das placas neuríticas (KADUSZKIEWICZ et al., 2005).

Embora considerados clinicamente significativos, os efeitos dos AChEIs são modestos. Rogers e colaboradores (1998) mostraram que a administração AChEIs em paciente com DA leve ou moderada, resulta em discretos benefícios a nível cognitivo e comportamental, em relação aos pacientes controle. Por outro lado, o mesmo estudo também detectou que os modestos benefícios apresentados por AChEIs são geralmente observados a partir de doze a dezoito semanas e, possivelmente, desaparecem após seis a oito semanas da interrupção do tratamento. (ROGERS et al., 1998) Além disso, estudos demonstram que estes medicamentos, em geral, são bem tolerados e com efeitos adversos resultantes da hiperativação colinérgica periférica, tais como: cefaleias, dores generalizadas, fadiga, náuseas, vômitos, anorexia, câibras, insônia, tonturas, depressão. (BAUMANN; JAMESON, 2013)

Adicionalmente a hipótese colinérgica, tem sido admitida a possibilidade de que a ativação glutamatérgica, através dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), contribua para a evolução da DA. Em regiões do encéfalo associadas às funções cognitivas e à memória, o glutamato demonstrou ser o principal neurotransmissor excitatório cerebral. Em regiões corticais e subcorticais que contêm neurônios e receptores do glutamato, esse neurotransmissor, quando presente em níveis elevados por períodos longos, gerou perdas estruturais e funcionais, pela sua característica excitotóxica que provoca a morte neuronal (JARVIS; FIGGITT, 2003).

Nesse sentido, para o tratamento de demência moderada a severa na DA, a memantina, um antagonista não-competitivo do receptor NMDA, é comumente utilizada (AISEN et al., 2012). Contudo, semelhante aos AChEIs, o benefício desse fármaco é meramente sintomático, tendo como potenciais efeitos adversos a constipação, tontura, dor de cabeça e sonolência.

Ensaio avaliando o benefício da terapia de combinação com AChEIs e memantina versus monoterapia resultaram em resultados contraditórios (SCHMIDT et al., 2015).

Quanto ao tratamento dos sintomas comportamentais na DA, como depressão e ansiedade, esse representa um desafio clínico (GAUTHIER et al., 2010). Os AChEIs podem melhorar parâmetros comportamentais, particularmente depressão e apatia, enquanto a memantina demonstrou melhorar a agitação e a irritabilidade (GAUTHIER et al., 2010). Ainda, como terapia para depressão e ansiedade, pode-se associar uso de antidepressivos como por exemplo, inibidores seletivos da recaptação da serotonina (IRSS) ou inibidores seletivos da recaptação da serotonina e norepinefrina (ISRSN).

Assim, considerando a DA sendo multifatorial, há necessidade de um plano farmacológico abrangente, em que diferentes elementos dessa fisiopatologia complexa sejam atingidos sinergicamente para que realmente o processo neurodegenerativo da DA possa ser modificado (RABINOVICI, 2019). Para compor tal plano, o bloqueio do sistema de cininas principalmente via BK e B2R, induzidos por A $\beta$ , poderia fazer parte de futuras intervenções terapêuticas que retardem ou previnam a instauração da DA. Assim, destaca-se o medicamento Icatibant (Firazyr, Shire), cujo princípio ativo é um antagonista seletivo do B2R denominado HOE-140, já utilizado na clínica, sob forma injetável, para o tratamento de ataques agudos de angioedema hereditário (AHE), um distúrbio autossômico dominante raro (prevalência estimada 1: 10.000-50.000) (CABALLERO et al., 2011; CICARDI et al., 2014).

## 2.4 MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA DA

Considera-se que 95% dos casos de DA são de origem esporádica (RABINOVICI, 2019). Entretanto, os modelos animais amplamente utilizados na pesquisa são, de fato, padrões baseados na genética da DA familiar, pelo fato de que há dificuldades no desenvolvimento de modelos para forma esporádica da DA devido o desconhecido iniciador do início da doença (ROWLAND; HOOPER; KELLETT, 2018). Em contrapartida, com exceção do tempo de início da doença, as características patológicas entre as formas são semelhantes, com abundantes acumulações de placas e emaranhados nas mesmas áreas do cérebro, bem como altos níveis de perda sináptica e neuronal (TURNER, 2006).

A DA tem sido amplamente estudada em diferentes modelos experimentais, afim de se obter *insights* sobre vários aspectos da patologia, bem como, avaliação de vias que poderiam fazer parte de futuras intervenções terapêuticas. De fato, modelos *in vitro*, injeção direta de oligômero de A $\beta$  em murinos, e com o desenvolvimento de métodos de biologia molecular, tem

sido gerada uma ampla gama de modelos de camundongos transgênicos baseados na expressão de APP e PS1 (ASHE; ZAHS, 2008; JANKOWSKY; ZHENG, 2017). Apesar de sua extensa validade na busca pelo entendimento da patogênese da DA, nenhum dos 100 tipos de modelos desenvolvidos até agora, é capaz de mimetizar a extensa perda neuronal e todas as demais características neuropatológicas da DA humana (AMRAM; FRENKEL, 2017). Assim, torna-se essencial considerar a questão experimental em estudo para a escolha do modelo a ser utilizado.

Genericamente, modelos de murinos transgênicos podem apresentar declínio cognitivo, disfunção e perda sináptica, placas amiloides, deposição de ENFs e inflamação, além de atrofia e morte neuronal (BALDUCCI; FORLONI, 2011; JANKOWSKY; ZHENG, 2017). Nesse sentido, aqui, optou-se por avaliar diferentes aspectos da DA abrangidos pelo modelo APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9</sup>, associados ao início precoce da DA.

O modelo APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>, descrito por Jankowsky et al. (2004), superexpressa a mutação sueca de APP, junto com PS1 deletado no éxon 9. A superexpressão da construção do transgene leva à superprodução de APP e PS1 com aumento concomitante na carga de A $\beta$  no parênquima. Apesar desse modelo não demonstrar uma perda neuronal extensa, formação de ENFs e inclusões tau-positivas, o modelo murino APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> exibe uma variedade de outros sintomas semelhantes a DA humana (JANKOWSKY et al., 2004). Estes incluem anormalidades neuríticas leves (GARCIA-ALLOZA et al., 2010), aumento da mortalidade neuronal, neuroinflamação, disfunção da BHE e declínio cognitivo robusto (KELLY et al., 2015; MINOGUE et al., 2014)

Götz et al., (2007) demonstram que embora esse modelo não apresente formação de ENFs, muitos mostram aumento da hiperfosforilação da tau. Isso pode ser devido (1) o acúmulo de A $\beta$  humano não ser presente o bastante para causar a formação de ENFs; (2) tau de murino possui uma composição e encadeamento diferentes que podem não ser propensas a formação de agregados; (3) média de vida dos camundongos não é prolongada o suficiente para permitir a hiperfosforilação/agregação suficiente à medida que essas patologias se desenvolvem ao longo de décadas em seres humanos; ou (4) uma combinação destes. (GÖTZ et al., 2007)

Quanto a avaliação cognitiva, Webster et al.(2014) demonstram que esse modelo murinho possui déficit na memória de trabalho desde os primeiros estágios da DA. Em fases posteriores, Ferguson et al., (2013) observaram diminuição da memória espacial. De fato, alguns estudos observam o início dos déficits cognitivos relacionados a níveis de A $\beta$  correlacionam-se com déficits comportamentais em camundongos APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9</sup> com dois e três (PILLAY; KELLAWAY; KOTWAL, 2008; VÉGH et al., 2014), quatro (BONARDI et

al., 2011) ou cinco (ZHU et al., 2017) meses de vida, embora a grande maioria dos estudos observam tais défices aos 6 e 7 meses de vida desses animais (JANKOWSKY et al., 2004; SHEN et al., 2017). Mais precocemente, as anormalidades de circulação sanguínea neural e neuroinflamação já são evidenciadas com dois meses de vida dos animais deste genótipo (BISCARO et al., 2012). Além disso, observa-se disfunção da barreira hematoencefálica na patogênese da DA (KELLY et al., 2015; MINOGUE et al., 2014). Estas alterações são observadas em pacientes com a DA e, portanto, o modelo APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9</sup> é capaz de abranger grande parte dos mecanismos celulares, moleculares e sistêmicos da patologia. Assim, a sua utilização é uma excelente ferramenta para estudos que buscam o entendimento e/ou terapias para a DA.

A despeito do outro modelo experimental utilizado neste trabalho, a administração i.c.v de oligômero de A $\beta$  solúveis (A $\beta$ OS) em murinos, tem seu efeito baseado na capacidade de agregação do peptídeo A $\beta$  em pequenos oligômeros ser uma das características mais importantes da patologia de DA. (BEYREUTHER; MULTHAUP; MASTERS, 1996). De fato, estudos identificaram os A $\beta$ OS em concentrações significativamente mais altas em cérebros acometidos com DA comparados com indivíduos controles, e revelaram ainda, que as características físico-químicas destes A $\beta$ OS endógenos são análogas a dos sintetizados *in vitro* (GONG et al., 2003; DE FELICE et al., 2008).

Haass e Selkoe (2007), Viola e Klein (2015) demonstraram que a forma oligomérica do peptídeo A $\beta$  são muito neurotóxicas, mesmo na ausência dos depósitos de grandes agregados de amiloides e, causam uma série de eventos como: dano imediato as sinapses neuronais (LAMBERT et al., 1998), ativação de diferentes vias de sinalização, perda da homeostase iônica, resposta inflamatória (DE FELICE et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2013; JANG et al., 2013) e consequente declínio cognitivo dos pacientes com DA.

Apesar de diversos estudos demonstrarem um maior potencial tóxico dos A $\beta$ Os para as sinapses, já foi demonstrado que a perda de sinapses é mais proeminente nas imediações das placas senis sugerindo que estas placas podem ser um reservatório de oligômeros sinaptotóxicos (DOROSTKAR et al., 2014; SHANKAR; WALSH, 2009). Lambert et.(1998), em estudo precursor, demonstraram que os A $\beta$ Os (também conhecidos como ADDLs, do inglês A $\beta$ -Derived Diffusible Ligands), danificam mecanismos de plasticidade sináptica por bloquear a potenciação de longa duração no hipocampo, evento fisiológico crucial para a aquisição e formação de memória (KOFFIEA et al., 2009). Corroborando esses estudos, Nimmrich et al. (2008) mostraram que os A $\beta$ OS contribuem na alteração do fluxo de cálcio pré-sináptica do tipo P/Q, que está relacionadas à neurotransmissão e à plasticidade sináptica, tanto nas sinapses

glutamatérgicas, quanto nas sinapses do ácido gama-amino-butírico (GABA)(NIMMRICH et al., 2008). Estudos revelam que o efeito dos A $\beta$ OS sobre as sinapses representa uma extensa redução do número de espinhas dendríticas (DE FELICE et al., 2009; KNOBLOCH; MANSUY, 2008; WEI et al., 2010). Como essas estruturas são espículas dos dendritos nas quais ocorrem as sinapses excitatórias, o impacto dos A $\beta$ OS nas sinapses sugere ser a base do déficit cognitivo observado nos pacientes com a DA causados principalmente, por perda da conectividade neural. Lacor e colaboradores, (2007) e Li e colaboradores, (2017) demonstram que os efeitos deletérios sobre as sinapses observados na DA são possivelmente consequência da capacidade dos A $\beta$ OS de se ligarem com grande especificidade a sítios sinápticos excitatórios.

Eventos adicionais causados pelos A $\beta$ OS, que também intervêm em processos sinápticos relevantes, incluem a fosforilação aberrante de tau em resíduos que caracteristicamente estão hiperfosforilados em cérebros de pacientes com DA (DE FELICE et al., 2008; ŠIMIĆ et al., 2016), além de estresse oxidativo (BUTTERFIELD; BOYD-KIMBALL, 2018; DE FELICE et al., 2007). Portanto, estudos sugerem que as sinapses são o principal alvo dos A $\beta$ OS, e que esta interação resulta na disfunção sináptica, provavelmente responsável pelo declínio cognitivo inicial que acomete indivíduos com DA (FERREIRA; KLEIN, 2011; SELKOE, 2002). Ainda, estudos validam através de modelo *in vitro* e em animais, a influência do modelo A $\beta$ OS afim de complementar os esforços para determinar o mecanismo e como alvo terapêutico para DA (KNOBLOCH et al., 2007; LAMBERT et al., 1998).

## 2.5 BRADICININA

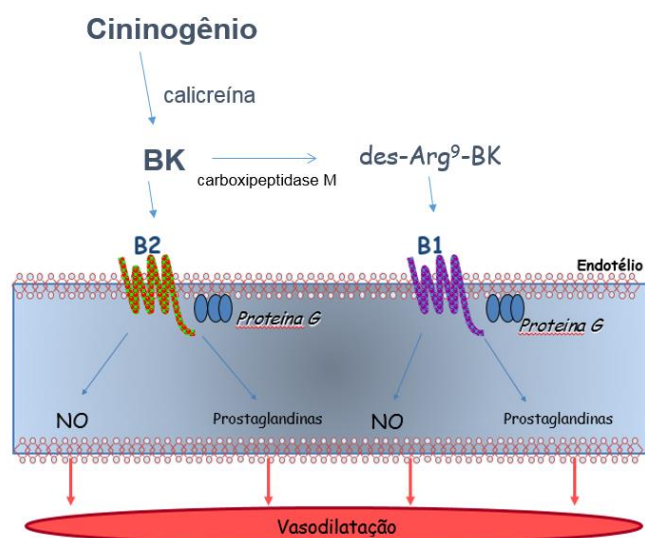
A bradicinina (BK) é um oligopeptídeo de nove aminoácidos (Arg1-Pro2-Pro3-Gly4-Phe5-Ser6-Pro7-Phe8-Arg9), que compõe a cascata metabólica do sistema caliceína-cininas. Este sistema inclui as enzimas caliceínas (serino-proteases) tecidual e plasmática,  $\alpha$ -globulinas com múltiplos domínios denominados cininogênios e por fim, as cininas bioativas: bradicinina (BK) e calidina. A caliceína plasmática, pode ser ativada pelo fator de contato XII, clivando os cininogênios e liberando as cininas (MARCEAU; REGOLI, 2004; MOREAU et al., 2005; ZAMOLODCHIKOV et al., 2015).

O sistema de cininas atua como mediador pró-inflamatório principalmente a nível periférico (WALKER; PERKINS; DRAY, 1995), causando principalmente, dor, aumento da permeabilidade vascular, produção de óxido nítrico, citocinas, radicais livres (FRANCEL,

1992), direcionamento de linfócitos para a polarização Th1 (ALIBERTI et al., 2003; IFUKU et al., 2007). Além disso, o sistema de cininas é amplamente conhecido tanto em cérebro de murinos (LI et al., 1999) como de humanos (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992). Assim, novas funções relacionadas à neuroinflamação têm sido descritas, entre elas a quimioatração de micróglia, edema cerebral (RAIDOO; BHOOLA, 1998), e disfunção da BHE (ALBERT-WEISSENBERGER; SIRÉN; KLEINSCHNITZ, 2013; GÖBEL et al., 2019; THORNTON et al., 2010). Nesse sentido, a BK está intimamente relacionada a patologias como angioedemas hereditários e adquiridos, cirrose hepática com ascite e doenças neurodegenerativas como a DA (GOLIAS et al., 2007; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MOREAU et al., 2005).

Os efeitos biológicos desse sistema são mediados através de dois tipos de receptores transmembrana acoplados à proteína G, denominados B1R e B2R, descritos há mais de 20 anos (REGOLI; BARABE, 1994). Os receptores do referido sistema foram caracterizados inicialmente com base em critérios farmacológicos de ordem de potência dos agonistas em experimento com órgão isolado. Posteriormente, esta classificação foi ratificada através de estudo com agonistas e antagonistas seletivos (STEWART et al., 1999). Nesse seguimento, o B2R é um receptor constitutivo que tem alta afinidade por BK e sensibilidade a baixas concentrações do seu antagonista sintético HOE- 140.

**Figura 2- Sistema de Cininas**



Fonte: Gomes et al. (1999) adaptado.

De fato, B2R está presente em uma grande variedade de tecidos, como no músculo liso, tecido nervoso e inclusive no sistema nervoso em desenvolvimento, conforme observado em embriões de camundongos (TRUJILLO et al., 2012) onde leva à formação de histamina e prostaglandinas (STERANKA et al., 1988).

Os receptores B1R e B2R são muito similares entre si, sendo umas das poucas características que os diferenciam, é o fato que B1R praticamente não sofre dessensibilização pós-ativação e apresenta alta afinidade pela des-Arg9BK (MATHIS; CRISCIMAGNA; LEEB-LUNDBERG, 1996). Sendo assim, B1R apresenta ação de amplificar e perpetuar a sinalização iniciada pela estimulação do B2R para os distintos padrões de sinalização celular (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

Quanto a ação da BK após ligação aos seus receptores, essa induz uma cascata de transdução de sinal, que envolve preferencialmente a proteína Gq, mas também pode envolver as proteínas Gs ou Gi (BLAUKAT et al., 1999; LIEBMANN et al., 1996) que, por sua vez, podem desencadear a ativação de diversas vias (BLAUKAT et al., 1999; LIEBMANN et al., 1996; PILLAT et al., 2016). Dessa forma, ressalta-se que a sinalização intracelular decorrente da ativação de B2R pode ser bastante intrincada e ter grande amplitude de acordo com o tipo e contexto celular, visto que, a eficácia de acoplamento de determinadas famílias de proteínas G varia com esses aspectos. Assim, Hanke e colaboradores (2006) demonstraram que em células COS-7, em ausência de estímulos miogênicos, o B2R atua aumentando a produção de Inositol trifosfato (IP3) e 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC). Já em neurônios da medula espinhal, observa-se a elevação na AMPC induzida por BK (KOHNO et al., 2008).

Ainda, a ativação das cininas pode estar relacionada à estimulação direta ou indireta de diversas vias de sinalização intracelular, como ativação da fosfolipase C, que leva à hidrólise do IP3, aumento do cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular, à translocação da proteína quinase C (PKC) para a membrana, a ativação da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), e da neuronal (nNOS) e da fosfolipase A2 (ALBERT-WEISSENBERGER; SIRÉN; KLEINSCHNITZ, 2013). Há também um aumento na produção de ácido araquidônico (XING; TAO; INSE, 1997) e, conseqüentemente, uma maior síntese de prostaglandinas, principal responsável pelo efeito mais conhecido das cininas, a vasodilatação (ALBERT-WEISSENBERGER; SIRÉN; KLEINSCHNITZ, 2013; MARCEAU; REGOLI, 2004; MOREAU et al., 2005). Além disso, o B2R promove a fosforilação transitória de tirosina a partir de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (LIEBMANN; BOHMER, 2000) especificamente a quinase regulada por sinal extracelular (ERK)1/2 e p38 (PILLAT et al., 2016; SABATINI et al., 2013), bem como a ativação do gene JAK/STAT em células endoteliais (JU et al., 2000).

## 2.6 BRADICININA E DA

Dentre vários fatores, a neuroinflamação está envolvida na patogênese e progressão da DA (ROJO et al., 2008). Dessa forma, a BK conhecida pelo seu papel mediador pró-inflamatório central (AUSTINAT et al., 2009; COUTURE et al., 2001; GIMPL et al., 1992) tem sido associada também na regulação da inflamação cerebral (HENEKA et al., 2015). Ainda, em estudo recente foi demonstrado a modulação da BHE de um modo dependente do receptor ativado por protease 2 (PAR2), também denominado como fator receptor de coagulação II (trombina) que medeia respostas inflamatórias, amplificando o tráfego de leucócitos para o SNC. (GÖBEL et al., 2019)

Nesse sentido, diversos elementos do sistema caliceína-cininas apresentam uma expressão aumentada no encéfalo dos pacientes com essa demência. (RAIDOO; BHOOLA, 1997; CHEN et al., 2000). De modo especial, foi observada uma regulação positiva de B2R em ratos infundidos com A $\beta$ , principalmente em hipocampo e o córtex, o que sugere o possível envolvimento de cininas em DA (VIEL et al., 2008).

Corroborando esses estudos, Ashby, Love e Kehoe, (2012) têm demonstrado que a cascata proteolítica das cininas, a iniciar pelo fator de contato XII (FXII), está demasiadamente ativada nos modelos murino e em pacientes acometidos pela DA. De fato, pacientes com tal demência exibem alta atividade da caliceína plasmática no parênquima cerebral (ASHBY; LOVE; KEHOE, 2012). Ainda, a estimulação do sistema de cininas se inicia com o FXII sendo diretamente ativado pelo A $\beta$  visto que esse último apresenta carga negativa (ZAMOLODCHIKOV et al., 2015).

Adicionalmente, em estudo *post-mortem*, foi determinado um aumento na transdução do sinal iniciado pela BK em fibroblastos humanos isolados de cérebros de portadores da DA, ocasionando uma hiperfosforilação da Tau. Ainda, de maneira interessante, Racchi e colaboradores (1998) demonstraram que a exposição de BK em fibroblastos promove um aumento na secreção da APP e ativação da via da MAPK e fosforilação ERK1 e ERK2 (KHAN; ALKON, 2006; VIEL; BUCK, 2011). Outros estudos identificaram mudanças em canais de potássio (K<sup>+</sup>) que são sensíveis a interações com A $\beta$ <sub>1-42</sub>, mobilização de cálcio mediada pela BK na fosforilação da MAPK (ZHAO et al., 2002). De maneira interessante, a incubação de células endoteliais expostas a proteína A $\beta$  também demonstraram aumento significativo na concentração de cininas nesta cultura (WIRTH et al., 1999). Huang e colaboradores (1998) demonstraram também, que a exposição da proteína A $\beta$  em cultura de linhagem neuronal do tipo PC12 promove um aumento na produção de IP3 e elevação dos níveis de cálcio citosólico



induzidos pela BK. Portanto, estes estudos apontam para a existência de uma possível retroalimentação em que o peptídeo A $\beta$  atua aumentando a secreção de cininas ativando os receptores de BK que, por sua vez, podem estimular a produção de A $\beta$  (IORES-MARÇAL et al., 2006).

Nesse seguimento, Viel et al. (2008) consideram que a o aumento da densidade de sítios de ligação para o B1R e B2R nas áreas relacionadas ao aprendizado e retenção de memória pode ser associado à neurodegeneração causada pela infusão A $\beta$ . Em trabalho realizado com animais knockouts foi demonstrada a atuação do B2R como neuroprotetor (LEMOS et al., 2010). Ainda, Bicca e colaboradores (2015) e Prediger et al. (2008) demonstram que o bloqueio farmacológico do B2R melhora índices de memória, reduz o número de micróglia ativas e os níveis de COX-2 e NOS.

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO- Kinin B2 Receptor blockade protects BBB breakdown and memory defects in Alzheimer's models for Brain Behavior and Immunity.**

\* submetido no periódico *Brain, Behavior and Immunity*

Fernanda Tibolla Viero<sup>1</sup>; Micheli Mainardi Pillat<sup>2\*</sup>; Carlos Fernando Mello<sup>1</sup>; Henning Ulrich<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 97105-900, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brasil.

\*To whom correspondence should be addressed: Micheli Mainardi Pillat, Ph.D. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, sala 858. Av. Professor Lineu Prestes, 748, São Paulo - 05508-000 - SP, Brasil

Tel.: 55 11 3091-9745. Fax: 55 11 3815-5579. Email: mmpillat@gmail.com.

## ABSTRACT

Neuroinflammation is inherent processes to the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), and therefore signs that promote this process can act as initial deleterious triggers. In this context, recent data show that the kinin system is stimulated by the pathologic amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) in AD patients. The effects of this system are primarily mediated by bradykinin (BK) and its kinin-B2 receptor (B2R) and comprehend the direct action permeabilization of the blood-brain barrier and inflammation. Still, the role of BK/B2R modulating in the processes AD pathogenesis and its progression is not completely understood. Thus, the aims of this study were demonstrated effects of B2R blockage in different AD models: transgenic double mice as a model of the familial AD (APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>) and injections of oligomeric  $A\beta$ -peptide in wild type C57BL6, both expressing or not B2R, or pretreated with B2R antagonist: HOE-140. The data obtained show the first evidence, that  $A\beta$  oligomers increased BBB permeability from blood and HOE-140 provided significant BBB protection against  $A\beta$  oligomers. In addict, the B2R antagonist reduced acetylcholinesterase (AChE) activity, suggesting that B2R modulation can actuate as a novel therapeutic strategy for AD, already used to treat Hereditary Angioedema. Interestingly also, both HOE-140 and the absence of B2R (B2R<sup>-/-</sup>) prevented long memory loss. Collectively, these results suggest that BK seems to be protagonist molecule in the processes observed in AD by B2 receptor. Therefore B2R blockage could be a target of prophylactic treatment in slowing DA neurodegeneration.

**Keywords:** kinin-B2 receptor; Alzheimer's disease; Knockout mice; APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice.

### 3.1 INTRODUCTION

Among the many factors that are involved in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease (AD), neuroinflammation is noteworthy and, therefore, signals that promote it can support or act as triggers for the establishment of the pathology [1]. In this sense, it is noted that the kinin system is closely related to immune responses, since it (i) is a potent mediator of the inflammation, (ii) favors the polarization of lymphocytes for the profile Th1 and (iii) increases the permeability of the blood-brain barrier (BBB). Interestingly, the kinin system is stimulated by the pathological amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) and is overly activated in patients with AD. The effects of kinins are mainly mediated by bradykinin (BK) and its B2 receptor (B2R). In addition, postmortem brains of individuals with AD revealed increased expression of B2R in the cortex and hippocampus (region responsible for memory processing and the first cognitive domain affected by AD) [2]. However, the role of BK/B2R signaling in the inherent processes of pathogenesis and progression of AD is unknown. Furthermore, there are no effective therapeutic alternatives to prevent the progression of this neurodegenerative

disease, whose incidence tends to increase proportionally to the life expectancy of the world population.

Thus, we seek to understand the role of B2R and its downstream mechanisms involved in neural inflammation and memory deficit in two experimental models of AD (APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice and i.c.v. injection of A $\beta$ ). To highlight the role of B2R in this pathology, the mice were treated with the B2R antagonist HOE-140 (currently employed in the treatment of hereditary angioedema), and B2R knockout mice were used in order to evaluate possible differences between the experimental models and to clarify the neurobiological alterations involved in both pathogenesis and progression of AD.

## 3.2 MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1 Animals

The experiments were performed using C57BL/6 male mice (20–25 g). Animals housed five to a cage, and maintained under controlled light and environment (12h light/dark cycle, lights on at 7:00, 22  $\pm$  1 °C, 55% relative humidity) with free access to food and water. Behavioral experiments were carried out during the light phase of the cycle (between 9:00 a.m. and 5:00 p.m.) where the animals were habituated for 1 h prior to experiments. All experimental protocols were designed with the goal of keeping the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy) and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of São Paulo (Process 5250180515).

### 3.2.2 Pharmacological treatment

To evaluate the involvement of B2R in the cognitive deficit and molecular alterations induced by A $\beta$  1–42 intracerebroventricular (i.c.v.) injection, some mice were treated with the following B2R selective antagonist: antagonist HOE 140, 50 pmol/site (Aventis, Frankfurt Main, Germany).

### 3.2.3 Mouse genotyping

Animals were genotyped before the studies using specific primers. APP/PS1  $\Delta$  E9 and B2<sup>-/-</sup> was carried out according to standard protocols. Briefly, genomic DNA was extracted from sections of mice tails and subjected to amplification using specific forward and reverse primers for the respective transgenic construct. Thermal cycling consisted of 35 cycles at 94 °C for 1 min, 52 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. PCR products were resolved on a 1.5% agarose gel, evidencing specific bands for transgenic animals after ethidium bromide staining.

### 3.2.4 A $\beta$ O<sub>s</sub>

Oligomers were prepared from synthetic A $\beta$  1–42 as described previously [3]–[5]. The Oligomer preparations were routinely characterized by size exclusion HPLC and comprised a mixture A $\beta$  dimers, trimers, tetramers, and higher molecular weight oligomers. Protein concentration was determined using the BCA assay (Thermo-Pierce).

### 3.2.5 Brain infusions in mice

Mice (n=8-10 per group) were anesthetized with 2.5% isoflurane (Cristália) using a vaporizer system (Norwell), as described previously [3], [6]. A 2.5-mm-long needle was unilaterally inserted 1mm to the right of the midline point equidistant from each eye and 1mm posterior to a line drawn through the anterior base of the eye [3], [6]. Two hours prior A $\beta$ O<sub>s</sub> 1–42 or PBS (Vh) i.c.v. injection, the antagonists were administered at a final dose of 50 pmol/site for HOE 140. Then, 10pmol A $\beta$ O<sub>s</sub> (or vehicle) was injected in a final volume of 3 $\mu$ l and the needle was kept in place for an additional 30s to prevent backflow. Precise placement of the injection site (needle track) was confirmed by dissecting the brain tissue after behavioral experiments. Mice that showed signs of misplaced injections or any sign of hemorrhage were excluded from further analysis.

### 3.2.6 Blood-Brain Barrier (BBB) permeability

The BBB permeability was assessed as described by [7], [8]. Twenty-four hours after i.c.v. administration of A $\beta$ O<sub>s</sub>, HOE-140 or vehicle, 100 $\mu$ L of fluorescein sodium (0.1mg/mL) was injected intraperitoneally. After thirty minutes, the Animals were anesthetized with

ketamine/xylazine (50/5 mg/kg, i.p.) and was perfused with 40 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) to remove all vascular content, brain was weighed and homogenized in 0.5 ml of PBS. Brain and serum samples were sequentially diluted in PBS (1:10 v/v) and in 20% trichloroacetic acid (TCA) (1:10 v/v). Brain samples were centrifuged at 1250g for 5 min, and the resulting supernatant was diluted in 20% TCA (1:10 v/v). All samples were incubated at 4 °C for 16 h and centrifuged at 1250g for 15 min to remove precipitated protein. The supernatant was removed and diluted in 1M Tris (pH 10, 1:2 v/v). The intensity of fluorescence emitted by the samples was evaluated by the excitation at 480nm and detection at 539 nm in a microplate reader (Flexstation). A standard curve for fluorescein quantification in the samples was generated by simultaneously analyzing fluorescein solutions prepared in 10% TCA and 0.5 M Tris. The degree of BBB permeability was measured as the percentage (w/v) of sodium fluorescein in a gram of brain tissue per the amount of sodium fluorescein in a milliliter of serum.

### **3.2.6 Determination of acetylcholinesterase activity in the brain**

The AChE enzymatic activity in hippocampus, prefrontal cortex and entorhinal cortex was determined by the Ellman et al. method [9] as modified by Rocha et al. (1993) This method is based on formation of the yellow 5-thio-2- nitrobenzoic acid, which was measured spectrophotometrically at 412 nm for 2 minutes at 25°C. The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and the AChE enzyme (40– 50 µg of protein), which was pre-incubated for 2 minutes. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide (AcSCh). The experiment was carried out in triplicate, and enzyme activity was expressed as µmol AcSCh/h/mg of protein.

### **3.2.7 Behavioural testing**

Object recognition test were based on the innate preference of rodents to explore novelty, and were carried out in an open field arena, measuring 30 × 30 × 30 cm wood chamber as described previously [10], [11]. The arena had its walls painted black, a front wall made of Plexiglas and a floor covered with ethyl vinyl acetate sheet. Illumination (about 40 lux) was provided by a light bulb hanging 60 cm above the apparatus. The temperature of the room was maintained at 22 °C. Total distance and velocity during the 5-minute open field session were recorded as measures of locomotor activity; no differences were found among the groups.

Animals were trained in a 5-min-long session during which they were placed at the center of the arena in the presence of two identical objects. Exploratory behavior (amount of time exploring each object) was recorded by trained researchers and performed with the support of Any Maze® software. Between each trial the apparatus was cleaned with a 30% ethanol solution to avoid odour cue. The retention test was performed at 24 h after the training session. In these 5-min test sessions, the animals were individually reintroduced in the OF, and one of the objects presented during training was randomly replaced by a new object, the difference resides on the shape of the object, not on its color. The time spent exploring the familiar and the novel object was recorded. The discrimination index was then calculated, taking into account the difference of time spent exploring the new and familiar objects,  $[(T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}}) / (T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})] * 100 (\%)$ , and used as a memory parameter.

Experiments and data analysis were conducted by an experimenter blind to treatment conditions. Parametric data with normal distribution were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA), in this case, two way, followed by Tukey's post hoc test. Values were plotted as mean  $\pm$  standard deviation. The significance level in all experiments was  $p < 0.05$ .

### 3.2.8 Statistical analysis

All analyses were performed with Prism 6.0 (GraphPad) and datasets were assessed for normality and group variance before statistical testing. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-tailed statistical tests are indicated in each figure (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). Post-test corrections were used every time multiple comparisons were performed (as indicated in each figure).

## 3.3 RESULTS

### 3.3.1 Establishment by crosses and genotypes of the colony of B2R<sup>-/-</sup> knockout mice containing the mutations for familial AD (APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9+/-</sup> B2R<sup>-/-</sup>).

For the study of the role of B2R in the pathogenesis and progression of familial Alzheimer's disease (AD), we used APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9+/-</sup> transgenic mice (experimental AD model) and B2R knockout mice (B2R<sup>-/-</sup>), both with C57/BL/6J genetic background. To obtain animals with the genotype of interest for the present study (APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9+/-</sup>/B2R<sup>-/-</sup>),

APP<sup>swE</sup>PS1<sup>dE9-/+</sup> mice were crossed with B2R<sup>-/-</sup> mice and, at least in the third generation, the desired genotype was achieved.

To make this experimental approach possible, numerous animal genotypes were used. To evaluate the B2 receptor, we used specific primers for this target and for resistance to Neomycin (Neo). Figure 1 shows the amplicons electrophoretically separated on agarose gel. For the evaluation of APP<sup>swE</sup>PS1<sup>dE9</sup> transgenes, we used specific primers for this target and for the endogenous genomic mouse PrP.

### **3.3.2 Studies on the integrity of the blood-brain barrier (BBB) in AD model animals (A $\beta$ O) following B2R pharmacological inhibition.**

It is known that BK/B2R signaling, besides triggering inflammatory processes, increases the permeability of the BBB. Therefore, we sought to investigate if the increase in BBB permeability, observed in AD model animals, occurs through BK/B2R signaling. To this end, the test of BBB Permeability to Sodium Fluorescein was performed 24 hours (Figure 2A) or 7 days (Figure 2B) after the injection of A $\beta$  oligomers and/or HOE-140 (B2 receptor antagonist).

As can be seen in Figure 2, samples of the brains of mice injected with  $\beta$ A oligomers showed a higher relative fluorescence intensity, suggesting that the treatment with  $\beta$ A oligomers leads to an increase in BBB permeability. Such evidence, so far never described for this experimental model, contributes to expand the understanding of the action of A $\beta$  oligomers in AD. On the other hand, the pharmacological inhibitor of the B2 receptor with HOE-140 reduced the influx of fluorescein in the brain in animals treated with A $\beta$  oligomers. These data suggest that alterations in BBB provoked by A $\beta$  oligomers are dependent on the action of bradykinin and its B2 receptor. In contrast, as can be seen in Figure 2B, after 7 days of treatment with A $\beta$ O it is no longer possible to observe the increase in sodium fluorescein levels in the brain of these animals. These data demonstrate that this model has a transient influence on BBB permeability.

### **3.3.3 Analysis of the activity levels of the enzyme acetylcholinesterase.**

The cholinergic hypothesis of AD describes that damage to cholinergic mechanisms in the temporal lobe and other areas of the brain is the basis of pathology [12]. Axons of cholinergic neurons originate in nuclei in the basal forebrain, especially the basal Meynert

nucleus, projecting into various cortical regions and into the hippocampus. The damages in the cholinergic system are related to cognitive symptoms of AD, and blocking the acetylcholinesterase enzyme (enzyme that degrades the acetylcholine neurotransmitter) is the mechanism of action of one of the most widely used modalities of pharmacological treatment for AD [13]. Thus, we quantified the levels of acetylcholinesterase enzyme activity in various regions of the brain in animals treated with A $\beta$  oligomers and/or HOE-140 (B2R antagonist). Interestingly, treatment with HOE-140 significantly inhibited the levels of acetylcholinesterase activity in prefrontal cortex (Figure 3B) of mice. These data suggest that the drug HOE-140 (already used in the medical clinic for the treatment of hereditary angioedema), may present the same action of the first-choice drugs for the treatment of AD. It is also possible to observe a propensity of reduction of acetylcholinesterase activity in the hippocampus and entorhinal cortex (Figure 3A and C).

### **3.3.4 Behavioral analyzes of wild mice and AD models (APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> and i.c.v. injection of A $\beta$ O), knockout or not for B2R.**

Considering the deficit in memory as the main clinical symptom of AD, we investigated the effect of the genetic and pharmacological deletion of the B2 receptor of kinins in memory of the AD model mice. Since a key objective of this work is to investigate the role of B2R in the pathogenesis of the disease, OR analyses were conducted in young animals at 3, 6 and 9 months of age (Figures 4A, B and C respectively). As expected, it was observed that APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> animals did not recognize the familiar object and, to our surprise, B2R<sup>-/-</sup> animals did not explore the new object for longer in relation to the familiar one either. Surprisingly, mice with the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>/B2R<sup>-/-</sup> genotype showed a better object recognition index, suggesting that blocking the B2 receptor has a beneficial effect in preventing the pathogenesis of Alzheimer's disease.

As a result of the effect per se observed in knockout animals for the B2 receptor of kinins (B2R<sup>-/-</sup>), we questioned whether they had undergone adaptations in their development that could influence the memory deficit results observed. To overcome this disadvantage of knockout animals and, simultaneously, test a drug already used in the medical clinic (for hereditary angioedema), we treated wild-type animals with HOE-140 (a B2R antagonist). OR tests were conducted 2 and 7 days (Figures 5A, 5B) after the injection with A $\beta$  oligomers and/or HOE-140. Treatment with HOE-140 had no effect per se in the OR, suggesting that animals with genetic deletion of B2R show some adaptation due to the absence of the receptor.



As expected, animals that received only A $\beta$  oligomers had a low recognition index (Figures 5A and 5B). In contrast, animals that were pretreated with the antagonist HOE-140 showed no damage to memory, suggesting that inhibition of B2R blocks the harmful effect of A $\beta$  oligomers and, consequently, blocks the pathogenesis of AD.

### 3.4 DISCUSSION

AD is interrelated with several mechanisms and pathologies occurring simultaneously. Several studies suggest the participation of the kinin system in AD, considering the relationship between its activation and interaction with A $\beta$  plaques. A $\beta$  plaques make anionic interactions contact factor XII, leading to kallikrein activation and BK formation [14]. In this sense, our results suggest the direct influence of BK in murine models of AD. Here, we verify decreased BBB permeability, decreased AChE activity and improved long-term memory of both B2R knockout animals familial AD mutations (APP<sup>swe</sup> / PS1dE9<sup>+/-</sup> B2R<sup>-/-</sup>) and animals injected with A $\beta$ OS and B2R antagonist, HOE-140.

Iturria-Medina and colleagues [15] in a data analysis composed of brain images, plasma and CSF biomarkers of 1171 patients, proposes that vascular dysfunction precedes  $\beta$ A plaque deposition, pathognomonic characteristic of AD. In this way, regarding family-type AD in an animal model, Kelly and colleagues [16] demonstrate BBB modifications in 4- to 5-month-old mice. Niwa and colleagues [17] in a study with transgenic APP mice (Tg212) showing to BBB dysfunction, observed decreased cerebral blood flow in the pathogenesis of AD. A $\beta$ Os, here we provided new evidence of a connection between pathological peptide and BBB modifications, suggesting that infusion with A $\beta$ Os leads to pro-inflammatory and cytotoxic events that contribute to the permeability of BBB in the brain. DA. In addition, we have also showed that pharmacological inhibition of B2R, generated by pretreatment with the HOE-140 antagonist, consistently prevents BBB dysfunction, demonstrating the involvement of the BK/B2R signaling pathway in the mechanism of increased BBB permeability observed in the A $\beta$ Os group.

The cholinergic hypothesis proposes that cholinergic neuron dysfunction contributes substantially to cognitive impairment in animal models [19]. Bartus [12] related this hypothesis to A $\beta$  and tau accumulation and cognitive deficit in AD patients. Likewise, Carvajal and Inestrosa [20] reported that AChE is able to accelerate the formation of A $\beta$  peptide and amyloid plaques, as well as an increase in neurotoxicity of AChE-A $\beta$  complexes in human brains. Similarly, in this work with murine model exposed to A $\beta$ Os we demonstrated increasing AChE

activity in hippocampus and entorhinal cortex. Rees and colleagues [21] observed the presence of A $\beta$  plaques and behavioral deterioration in the working memory test in a double transgenic acetylcholinesterase-APP animal model. Similar to that observed in the present work with A $\beta$ O<sub>s</sub> injection model, Shi and Holtzman [22] observed an increase of AChE activity in entorhinal cortex and hippocampus in APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9<sup>+/-</sup> model. Furthermore, we demonstrate that treatment of mice with selective B2R antagonists had an important effect in decreasing AchE activity, especially in prefrontal cortex, a region highly associated with learning and memory [23]. Further studies are necessary to demonstrate the exact mechanism of AchE inhibition observed upon treatment with HOE. However, the effect of HOE-140 on AchE observed in this study points to this drug as a therapeutic strategy for AD. This effect is especially important since current therapies designed to attempt to reverse cholinergic deficit are largely AChE inhibitors that are modestly effective and transient owing to their low efficacy and limited duration of cognitive benefit [24], [25]. Indeed, one of the most prominent features of AD is memory dysfunction [26]. In order to verify possible symptoms of the pathogenesis of AD, we evaluated cognition in the murine APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 genotype model, with age, at 3, 6 and 9 months, by object recognition task. We observed long-term memory deficits in these animals at ages. Similar to that observed in the present study, other researchers observed memory deficits in these APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 mice from two months of age [27]–[31]. However, several studies have not been able to observe working memory deficits in APP<sup>swe</sup> / PS1 $\Delta$ E9 mice less than 7 months old [16], [32], [33].

Furthermore, we identified the effect *per se* of B2R<sup>-/-</sup> animals on cognitive assessment. These results corroborate those observed by Lemos and colleagues [34] suggesting that the absence of B2R precipitates the installation of neurodegenerative processes. In order to overcome this anticipation of neurodegeneration observed in cognitive impairment, we used the pharmacological antagonist of this receptor. In fact, treatment with HOE-140 did not result in an effect *per se* in relation to mouse memory. Additionally, we demonstrated memory improvement with HOE-140 pretreatment in A $\beta$ O-infused mice at 48 hours and 7 days after A $\beta$ OS 1-42 infusion. Similarly results were previously obtained, although in these studies the model of AD was performed by A $\beta$ 1-40 injection [12], [35] and memory assessment was performed 14 days after amyloid peptide infusion [36].

The characteristic mutations of familial AD are present in the individual since embryonic development, thus, the absence of B2R in development of APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 mice could provide benefits, delaying the early development of the disease. Our study was the first to develop and evaluate the effects of APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9/B2R<sup>-/-</sup> triple transgenic animals.

Collectively, our results show that blocking B2R with the selective antagonist HOE 140 consistently inhibits BBB breakdown and increase of AChE activity induced by AB in the mice, and, hence reduces the cognitive impairment in mouse. These results suggest that B2R blocking could be pharmacological target to DA.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). H.U. and C.L. acknowledge grant support from the São Paulo State Foundation FAPESP (project No. 2012/50880-4, 2015/19128-2 and 2016/26189-0), Brazil.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflicts of interest for this manuscript.

## REFERENCES

- [1] L. E. Rojo, J. A. Fernández, A. A. Maccioni, J. M. Jimenez, and R. B. Maccioni, "Neuroinflammation: Implications for the Pathogenesis and Molecular Diagnosis of Alzheimer's Disease," *Arch. Med. Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–16, 2008.
- [2] O. Yasuhara, D. G. Walker, and P. L. McGeer, "Hageman factor and its binding sites are present in senile plaques of Alzheimer's disease," *Brain Res.*, vol. 654, no. 2, pp. 234–240, 1994.
- [3] C. P. Figueiredo *et al.*, "Memantine Rescues Transient Cognitive Impairment Caused by High-Molecular-Weight A Oligomers But Not the Persistent Impairment Induced by Low-Molecular-Weight Oligomers," *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 23, pp. 9626–9634, 2013.
- [4] C. Madeira *et al.*, "D-serine levels in Alzheimer's disease: Implications for novel biomarker development," *Transl. Psychiatry*, vol. 5, no. February, 2015.
- [5] G. S. Seixas da Silva *et al.*, "Amyloid- $\beta$  oligomers transiently inhibit AMP-activated kinase and cause metabolic defects in hippocampal neurons," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 18, pp. 7395–7406, 2017.
- [6] J. H. Ledo *et al.*, "Amyloid- $\beta$  oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice," *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 10, pp. 1053–1054, 2013.
- [7] J. D. Morrey *et al.*, "West Nile virus infection in rodents," vol. 80, no. 3, pp. 377–379, 2009.

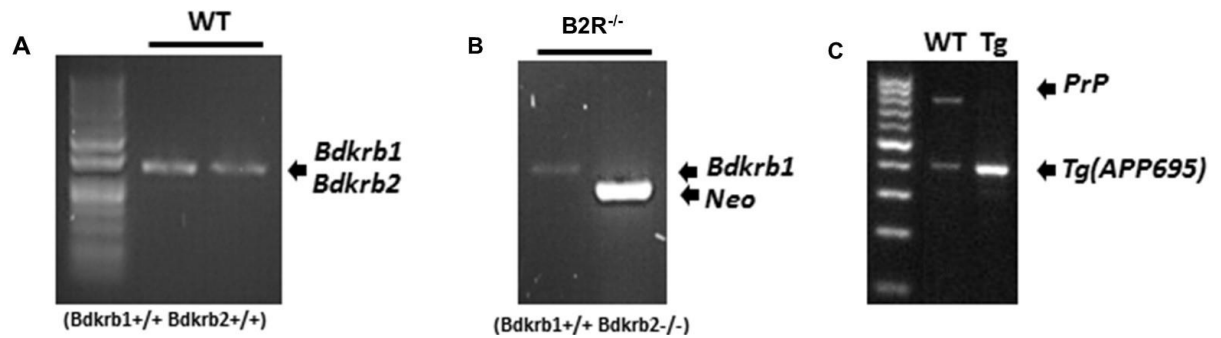
- [8] Q. F. Lenz *et al.*, “Cysteinyl leukotriene receptor (CysLT) antagonists decrease pentylentetrazol-induced seizures and blood-brain barrier dysfunction,” *Neuroscience*, vol. 277, no. August, pp. 859–871, 2014.
- [9] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, And R. M. Feather-Stone, “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, pp. 88–95, 1961.
- [10] A. L. Caetano *et al.*, “Kinin B2 receptor can play a neuroprotective role in Alzheimer’s disease,” *Neuropeptides*, vol. 53, pp. 51–62, 2015.
- [11] M. V Lourenco *et al.*, “Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer’s models.,” *Nat. Med.*, vol. 25, no. 1, pp. 165–175, 2019.
- [12] R. T. Bartus, “On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: Lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis,” *Exp. Neurol.*, vol. 163, no. 2, pp. 495–529, 2000.
- [13] A. Caccamo *et al.*, “M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice,” *Neuron*, vol. 49, no. 5, pp. 671–682, 2006.
- [14] J. S. Joseph, M. C. M. Chung, K. Jeyaseelan, and R. M. Kini, “Amino acid sequence of trocarin, a prothrombin activator from *Tropidechis carinatus* venom: Its structural similarity to coagulation factor xa,” *Blood*, vol. 94, no. 2, pp. 621–631, 1999.
- [15] Y. Iturria-Medina *et al.*, “Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer’s disease based on multifactorial data-driven analysis,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. May, 2016.
- [16] P. Kelly, P. Denver, S. C. Satchell, M. Ackermann, M. A. Konerding, and C. A. Mitchell, “Microvascular ultrastructural changes precede cognitive impairment in the murine APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> model of Alzheimer’s disease,” *Angiogenesis*, vol. 20, no. 4, pp. 567–580, 2017.
- [17] K. Niwa, K. Kazama, L. Younkin, S. G. Younkin, G. A. Carlson, and C. Iadecola, “Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 283, no. 1, pp. H315–H323, 2002.
- [18] M. A. Erickson and W. A. Banks, “Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer’s disease,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 33, no. 10, pp. 1500–1513, 2013.
- [19] A. V Terry Jr and J. J. Buccafusco, “The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer’s disease- related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 306, no. 3, pp. 821–827, 2000.
- [20] F. J. Carvajal and N. C. Inestrosa, “Interactions of AChE with A $\beta$  Aggregates in Alzheimer’s Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol.

- 4, no. September, pp. 1–10, 2011.
- [21] T. Rees *et al.*, “Memory Deficits Correlating with Acetylcholinesterase Splice Shift and Amyloid Burden in Doubly Transgenic Mice,” *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 291–300, 2005.
- [22] Y. Shi and D. M. Holtzman, “Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 12, pp. 759–772, 2018.
- [23] G. E. Haley, S. G. Kohama, H. F. Urbanski, and J. Raber, “Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2, apoE, and GFAP levels in the rhesus macaque prefrontal cortex and hippocampus,” *Age (Omaha)*, vol. 32, no. 3, pp. 283–296, 2010.
- [24] H. Basun, C. Nilsbertha, C. Eckman, L. Lannfelt, and S. Younkin, “Plasma Levels of A $\beta$  42 and A $\beta$  40 in Alzheimer Acetylcholinesterase Inhibitor Tacrine,” pp. 156–160, 2002.
- [25] E. Giacobini, R. Spiegel, A. Enz, A. E. Veroff, and N. R. Cutler, “Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer’s disease by rivastigmine: Correlation with cognitive benefit,” *J. Neural Transm.*, vol. 109, no. 7–8, pp. 1053–1065, 2002.
- [26] G. M. McKhanna *et al.*, “The diagnosis of dementia due to AD: Recommendations from the NIA,” *diagnosis Dement. due to Alzheimer’s Dis. Recomm. from Natl. Inst. Aging-Alzheimer’s Assoc. Work. diagnostic Guidel. Alzheimer’s Dis.*, vol. 7, no. 3, pp. 263–269, 2012.
- [27] C. Bonardi, F. de Pulford, D. Jennings, and M. C. Pardon, “A detailed analysis of the early context extinction deficits seen in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> female mice and their relevance to preclinical Alzheimer’s disease,” *Behav. Brain Res.*, vol. 222, no. 1, pp. 89–97, 2011.
- [28] J. L. Jankowsky *et al.*, “APP<sup>x</sup>PS1-Ki mouse model of Alzheimer’s disease,” vol. 25, no. 21, pp. 1–12, 2005.
- [29] T. P. O’Leary and R. E. Brown, “Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer’s disease,” *Behav. Brain Res.*, vol. 201, no. 1, pp. 120–127, 2009.
- [30] N. S. Pillay, L. A. Kellaway, and G. J. Kotwal, “Early detection of memory deficits and memory improvement with vaccinia virus complement control protein in an Alzheimer’s disease model,” *Behav. Brain Res.*, vol. 192, no. 2, pp. 173–177, 2008.
- [31] A. Savonenko *et al.*, “Episodic-like memory deficits in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer’s disease: Relationships to  $\beta$ -amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 18, no. 3, pp. 602–617, 2005.
- [32] S. A. Ferguson, S. Sarkar, and L. C. Schmued, “Longitudinal behavioral changes in the

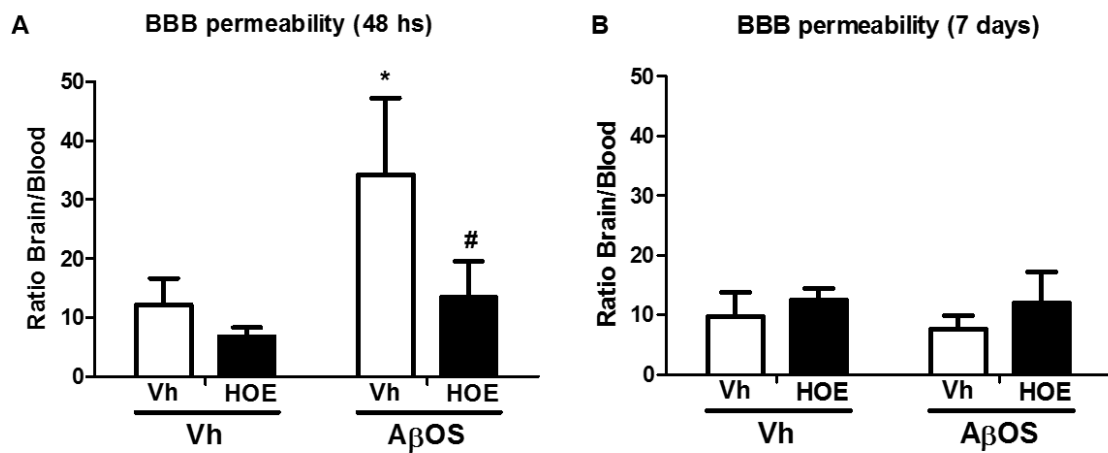
- APP/PS1 transgenic Alzheimer's Disease model," *Behav. Brain Res.*, vol. 242, no. 1, pp. 125–134, 2013.
- [33] E. Faivre and C. Hölscher, "Neuroprotective effects of D-Al2GIP on Alzheimer's disease biomarkers in an APP/PS1 mouse model," *Alzheimer's Res. Ther.*, vol. 5, no. 2, p. 20, 2013.
- [34] M. T. R. Lemos *et al.*, "Role of kinin B1 and B2 receptors in memory consolidation during the aging process of mice," *Neuropeptides*, vol. 44, no. 2, pp. 163–168, 2010.
- [35] R. D. S. Prediger *et al.*, "Genetic deletion or antagonism of kinin B1 and B2 receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease," *Neuroscience*, vol. 151, no. 3, pp. 631–643, 2008.
- [36] M. A. Bicca, R. Costa, G. Loch-Neckel, C. P. Figueiredo, R. Medeiros, and J. B. Calixto, "B2 receptor blockage prevents A $\beta$ -induced cognitive impairment by neuroinflammation inhibition," *Behav. Brain Res.*, vol. 278, pp. 482–491, 2015.

## Figures Subtitles

**Figure 1.** Genotyping of B2R knockout mice and Transgenic (Tg) APP<sup>swE</sup>PS1<sup>dE9</sup>(APP/PS1), model of familial Alzheimer's disease. **A)** Genotyping of wild mice. The genomic DNA of the mice was extracted from small biopsies and amplified by PCR with specific primers for a region of the B2R and B1R gene. **B)** Genotyping of B2R<sup>-/-</sup> mice and a region of the Neomycin resistance gene. **C)** Genotyping of the AD model mice. The genomic DNA was evaluated by PCR using the specific primers for a region of the endogenous genomic mouse PrP promoter and for the TgAPP695.

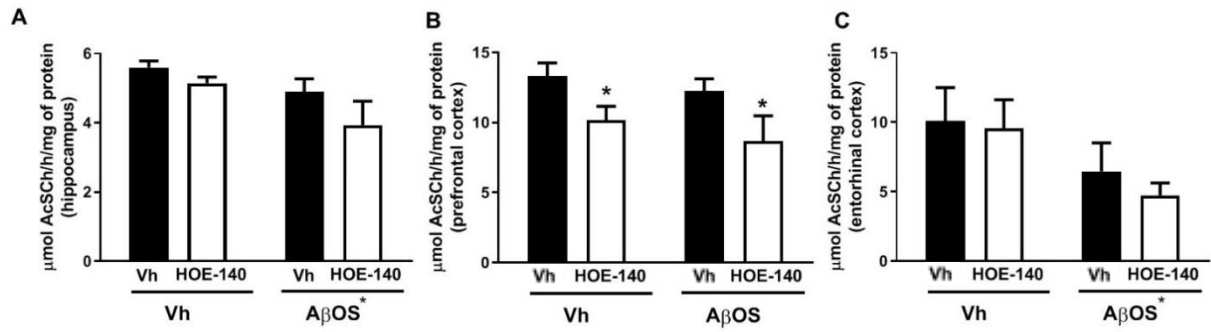


**Figure 2.** Detection of fluorescence emitted by fluorescein in the brain of animals, 24h (A) and 7 days (B) after the treatment with A $\beta$ Os (100pmol/site), HOE-140 (B2R antagonist) and/or vehicle. The increase in percentage of the fluorescence intensity of the brain in relation to the blood (100%), detected at 539nm, reflects the increase in permeability of the blood-brain barrier (BBB). Data are expressed as mean  $\pm$ SEM. (n = 8-10 mice per group). \*P < 0.05 compared to Vh group. #P < 0.05 compared to HOE/A $\beta$ <sup>1-42</sup> treated group. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.

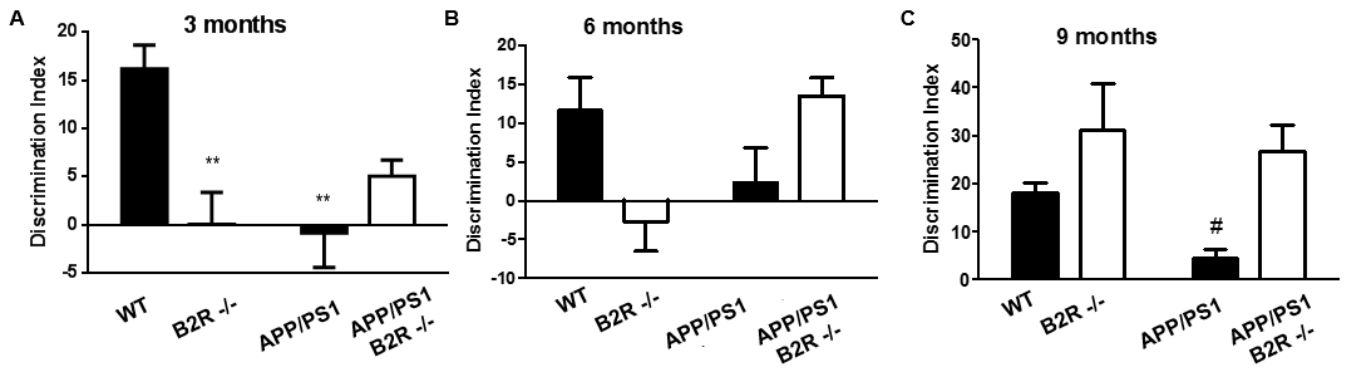




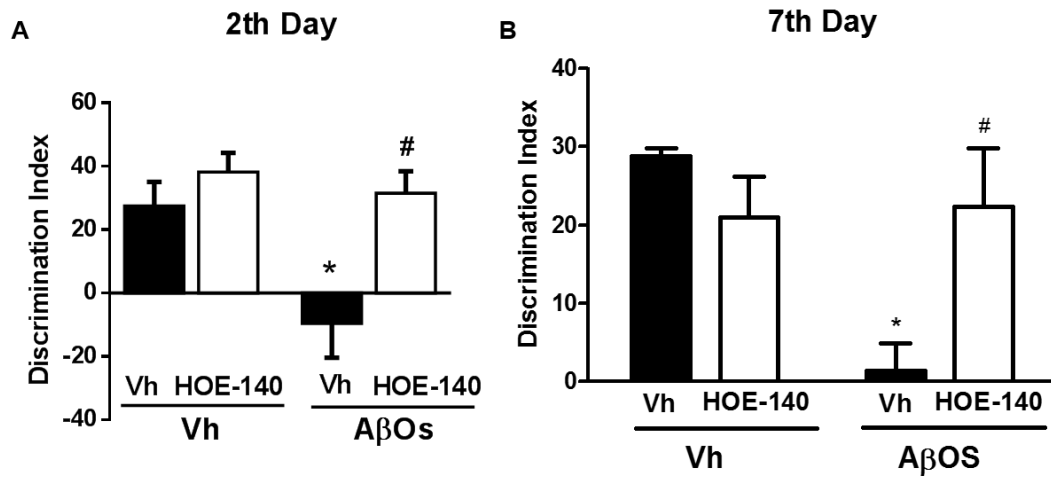
**Figure 3.** Analysis of activity levels of the acetylcholinesterase enzyme in the (A) hippocampus, (B) prefrontal cortex and (C) entorhinal cortex of mice treated with A $\beta$  oligomers and/or HOE-140. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. (n = 8-10 mice per group). \*P < 0.05 compared to Vh group. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.



**Figure 4.** Object Recognition Tests (OR) to observe possible cognitive deficits. The tests were carried out in wild-type mice (WT), APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> and APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>/B2R<sup>-/-</sup> with 3 (A) 6 (B) and 9 (C) months of age. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. (n = 6- 8 mice per group). \*\*P < 0.001 compared to Vh group. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.



**Figure 5.** Cognitive deficit induced by A $\beta$  oligomers is suppressed in animals treated with HOE-140 (B2R antagonist). Object Recognition test (OR) conducted 2 days (A) or 7 days (B) after the i.c.v. injection of A $\beta$  oligomers (A $\beta$ OS; 100 pmol/site) and/or vehicle (Vh) and/or (HOE-140) wild-type mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. (n = 8-10 mice per group). \*P < 0.05 compared to Vh group. #P < 0.05 compared to HOE/A $\beta$ OS<sup>1-42</sup> treated group. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.



## 4 DISCUSSÃO

Vários estudos sugerem a participação do sistema de cininas na DA, visto a relação entre a sua ativação e a interação com as placas de  $\beta$ A. As placas  $\beta$ A fazem interações aniônicas com agregado de  $\beta$ A do tipo 1-42, levando a liberação de calicreína e consequente formação de BK (JOSEPH et al., 1999). Nesse sentido, este estudo apresenta resultados que corroboram a influência direta da BK em modelos murinos de DA. Aqui, verificamos a diminuição da permeabilidade da BHE, redução da atividade de AChE e a melhora da memória de longo prazo tanto de animais knockout para o B2R contendo mutações para a DA familiar ( $APP^{swe}/PS1^{dE9+/-} B2R^{-/-}$ ) quanto em animais injetados com A $\beta$ Os e antagonista de B2R, o HOE-140.

Para Iturria-Medina et al. (2016) em análise recente de dados composta por imagens cerebrais, plasma e biomarcadores de LCR de 1171 pacientes, propõe que a disfunção vascular precede a deposição de placa  $\beta$ A, característica patognomônica da DA. Nesse sentido, quanto a DA do tipo familiar mimetizada em modelo animal, Kelly et al. (2017) demonstram modificações da BHE em murinos com 4 a 5 meses. Niwa et al., (2002) em estudo com camundongos transgênicos APP (Tg212) além da disfunção da BHE, observaram diminuição do fluxo sanguíneo cerebral na patogênese da DA. Entretanto, em modelo murino injetados com A $\beta$ Os este estudo fornece a primeira evidência de relação entre o peptídeo patológico e modificações da BHE, sugerindo que a infusão com A $\beta$ Os levam a eventos pró-inflamatórios e citotóxicos que contribuem para a maior permeabilidade da BHE no cérebro de DA (ERICKSON; BANKS, 2013). Além disso, também demonstramos que a inibição farmacológica gerada pelo pré-tratamento com o antagonista HOE-140 previne consistentemente a disfunção da BHE, evidenciando o envolvimento da via de sinalização BK/B2R no mecanismo de aumento da permeabilidade da BHE observado no grupo A $\beta$ Os.

A hipótese colinérgica propõe que a disfunção de neurônios colinérgico contribui substancialmente para o declínio cognitivo modelos animais (TERRY; BUCCAFUSCO, 2003). Bartus (2000) relacionou essa hipótese com o acúmulo de A $\beta$  e tau e o comprometimento cognitivo em pacientes com DA. Da mesma forma, Carvajal e Inestrosa (2011) relataram que a AChE é capaz de acelerar a formação do peptídeo A $\beta$  e as placas amiloides, bem como um aumento na neurotoxicidade dos complexos AChE- $\beta$ A em cérebros humanos. Similarmente, neste trabalho com modelo murino exposto a A $\beta$ Os demonstramos crescente atividade da AChE em hipocampo e córtex entorrinal. Rees e colaboradores (2005) observaram a presença de placas de  $\beta$ A e deterioração comportamental no teste de memória de trabalho em modelo animal duplo transgênico acetilcolinesterase-APP. Similarmente ao observado no presente trabalho

com modelo de injeção com A $\beta$ Os, Shi e Holtzman (2018) observaram um aumento da atividade da AChE no córtex entorrinal e hipocampo em modelo APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9+/-</sup>. Além disso, aqui demonstramos que o tratamento dos camundongos com antagonista seletivo de B2R teve efeito importante na diminuição da atividade da AchE, principalmente em córtex pré frontal, região altamente associada com aprendizado e memória (HALEY et al., 2010). Mais estudos são necessários para demonstrar o mecanismo exato da inibição da AchE observada após tratamento com HOE. Entretanto, o efeito de HOE-140 sobre AchE observado nesse estudo aponta este fármaco como uma estratégia terapêutica para a DA. Tal efeito é especialmente importante visto que as terapias atuais projetadas para tentar reverter o déficit colinérgico são em grande parte, inibidores da AChE que se apresentam modestamente eficazes e transitórios, devido sua baixa eficácia e duração limitada do benefício cognitivo (BASUN et al., 2002; GIACOBIN et al., 2002)

De fato, uma das características mais proeminentes da DA é a disfunção da memória (MCKHANN et al., 2011). Acerca disso, a fim de verificar possíveis sintomas da patogênese da DA, avaliamos a cognição no modelo murino de genótipo APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9, com idade de 3, 6 e 9 meses, por tarefa de reconhecimento de objeto. Observamos déficits da memória de longo prazo nesses animais. De forma similar ao observado no presente estudo, outros pesquisadores observaram défices de memória nesses camundongos APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 a partir dois meses de vida (BONARDI et al., 2011; JANKOWSKY et al., 2005; O'LEARY; BROWN, 2009; PILLAY et al., 2008; SAVONENKO et al., 2005). Entretanto, vários estudos não foram capazes de observar défices de memória de trabalho em murinos APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 com menos de 7 meses de vida. (KELLY et al., 2017; FERGUSON; SARKAR; SCHMUED, 2013; FAIVRE; HÖLSCHER, 2013; MCCLEAN et al., 2011).

Ainda, identificamos o efeito *per se* de animais B2R<sup>-/-</sup> em avaliação cognitiva. Esses resultados corroboram aos observados por Lemos e colaboradores (2010) sugerindo que a ausência do B2R precipita a instalação de processos neurodegenerativos. Afim de superar essa antecipação da neurodegeneração observada no déficit cognitivo, utilizamos o antagonista farmacológico deste receptor. De fato, o tratamento com HOE-140 não resultou em efeito *per se* em relação memória dos camundongos. Adicionalmente, demonstramos melhora acentuada da memória com pré-tratamento do antagonista de B2R: HOE-140 em camundongos infundidos com A $\beta$ Os em 48 horas e 7 dias pós infusão de A $\beta$ OS 1-42. Resultados semelhantes foram previamente obtidos, embora nesses estudos tenha se mimetizado a DA através de injeção A $\beta$ 1-40 (BARTUS, 2000; PREDIGER et al. 2008) e a avaliação da memória ter sido realizada após 14 dias da infusão do peptídeo amiloide (BICCA et al., 2015). Nesse sentido, apesar da porção

1-40 ser mais abundante, a forma  $A\beta_{1-42}$  é mais hidrofóbica e propensa à agregação, que pode estimular a formação de placas compostas de  $\beta A$  e consequente declínio cognitivo. (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

Visto que as mutações características da DA familiar estão presentes no indivíduo desde o seu desenvolvimento embrionário, a ausência do B2R desde o desenvolvimento de camundongos APP/PS1 poderia fornecer benefícios, tardando o desenvolvimento precoce da doença. Nosso estudo foi o primeiro a desenvolver e avaliar os efeitos de animais triplo transgênicos APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta E9$ /B2R<sup>-/-</sup>. Assim, a deleção de B2R (B2R<sup>-/-</sup>) impediu significativamente o declínio da memória em camundongos transgênicos para a DA tipo familiar, avaliado por reconhecimento de objeto. Assim, à luz de todos os dados, mostramos que o bloqueio de B2R poderia ser um alvo de eficácia profilática na desaceleração da neurodegeneração.

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ A injeção i.c.v de A $\beta$ Os em camundongos resulta no aumento transitório da permeabilidade da BHE.
- ✓ O bloqueio de B2R previne permeabilidade da BHE desencadeado pelos A $\beta$ Os.
- ✓ O tratamento com o fármaco HOE-140 resulta na diminuição da atividade da AchE.
- ✓ O prejuízo na memória desencadeado pelos A $\beta$ Os é dependente da atividade do B2R.
- ✓ O prejuízo na memória observado em camundongos APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9+/-</sup> é mediado pelo B2R.
- ✓ A BK, via B2R, atua como uma molécula protagonista nos processos observados na DA.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, N. et al. Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP SWE transgenic mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 126, n. 1–2, p. 50–57, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020956>>. Acesso em: 12 fev. 2019. DOI: 10.1016/S0165-5728(02)00050-4
- AISEN, P. S. et al. Symptomatic and Nonamyloid/ Tau Based. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v.2, n.3, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393531>>. Acesso em: 17 fev.2019. DOI:/10.1101/cshperspect.a006395
- ALBERT-WEISSENBERGER, C.; SIRÉN, A. L.; KLEINSCHNITZ, C. Ischemic stroke and traumatic brain injury: The role of the kallikrein-kinin system. **Progress in Neurobiology**, v. 101–102, n. 1, p. 65–82, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274649>>. Acesso em: 16 abr. 2019. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2012.11.004
- ALIBERTI, J. et al. Cutting Edge: Bradykinin Induces IL-12 Production by Dendritic Cells: A Danger Signal That Drives Th1 Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 11, p. 5349–5353, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759407>>. Acesso em: 12 abr.2019. DOI: 10.4049/jimmunol.170.11.5349.
- AMRAM, S.; FRENKEL, D. Animal Models of Alzheimer’s Disease. **Neuroprotection in Alzheimer's Disease**. v.1, p. 31–58, 2017. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012803690700003X?via%3Dihub> >. Acesso em: 10 fev. 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-803690-7/00003-X.
- ASHBY, E. L.; LOVE, S.; KEHOE, P. G. Assessment of activation of the plasma kallikrein-kinin system in frontal and temporal cortex in Alzheimer’s disease and vascular dementia. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 7, p. 1345–1355, 2012. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197458010004185>>. Acesso em: 12 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.024
- ASHE, K. H.; ZAHS, K. R. Probing the biology of Alzheimer’s disease in mice. **Neuron**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547123>>. Acesso em: 12 mar. 2019. DOI: 10.1038/jid.2014.371
- AUSTINAT, M. et al. Blockade of bradykinin receptor b1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. **Stroke**, v. 40, n. 1, p. 285–293, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988906>>. Acesso em: 15 maio. 2019. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.526673.
- BALDUCCI, C.; FORLONI, G. App transgenic mice: Their use and limitations. **NeuroMolecular Medicine**, v. 13, n. 2, p. 117–137, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152995>>. Acesso em: 15 fev. 2019. DOI: 10.1007/s12017-010-8141-7
- BARTUS, R.T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Exp**

**Neurol.** n.163, v.2, p.495-529, 2000. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10833325>>. Acesso em: 17 fev.2019. DOI: 10.1038.10.040

BASUN, H. et al. Plasma levels of Abeta42 and Abeta40 in Alzheimer patients during treatment with the acetylcholinesterase inhibitor tacrine. **Dement Geriatr Cogn Disord.** v.14, n.3, p.156-60, 2002. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218259>>. Acesso em: 12 jan.2019. DOI: 10.1159/000063605.

BAUMANN, G.P; JAMESON, J.L. **Harrison's Manual of Medicine.** 18 Ed. 2013. Disponível em: < <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1820>>. Acesso em: 17 abr. 2019.

BALLARD, C. et al. **Nonpharmacological Treatment of Alzheimer Disease.** v. 83, n. 10, p. 12, 2011. Disponível em: < [www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician1403](http://www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician1403) >. Acesso em: 06 abr.2019. DOI: 10.1038/jid.2014.371.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. **PORTARIA Nº 491, DE 23 DE SETEMBRO DE 2010.** Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0491\\_23\\_09\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0491_23_09_2010.html)>. Acesso em: 15 jun. 2018.

BECKER, R. E. Cognitive Deficit in Ad Therapy Of The Cognitive Deficit In Alzheimer's Disease. **The Cholinergic System.** v.1, p.650-670, 1985. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-6738-1\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-6738-1_1)>. Acesso em: 08 mar. 2019. DOI: 10.1111/j.1600-0404.1996.tb05875.x.

BERGAMASCHINI, L. et al. The region 1-11 of Alzheimer amyloid- $\beta$  is critical for activation of contact-kinin system. **Neurobiology of Aging,** v. 22, n. 1, p. 63–69, 2001. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S019745800001743>>. Acesso em: 10 jan. 2019. DOI: 10.1016/S0197-4580(00)00174-3

BEKRIS, L. D. et al. Genetics of Alzheimer Disease. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology,** v. 23, n. 4, p. 213-227, 2010. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3044597/>>. Acesso em: 18 abr. 2019. PMID: 21045163

BEYREUTHER K; MULTHAUP G; MASTERS CL. Alzheimer's disease: genesis of amyloid. **Ciba Found Symp.** v.199, p.119-27. 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915607>>. Acesso em: 23 jun.2019. PMID: 8915607

BHoola, K. D.; FIGUEROA, D.; WORTHY, K. Bioregulation of Kinins : Kallikreins, kininogens, and Kininases. **Pharmacological Reviews,** v. 44, n. 1, p. 1–80, 1992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313585>>. Acesso em: 18 fev. 2019. PMID:1313585

BICCA, M. A. et al. B2 receptor blockage prevents A $\beta$ -induced cognitive impairment by neuroinflammation inhibition. **Behavioural Brain Research,** v.278, p.482–491, 2015. Disponível



- em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814007050?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 mar.2019. DOI:10.1016/j.bbr.2014.10.040
- BIRKS, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer 's disease ( Review ). **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 2006, n. 1, p. 1–3, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437532>>. Acesso em: 18 fev. 2019. DOI: /10.1002/14651858.
- BISCARO, B. et al. Inhibition of microglial activation protects hippocampal neurogenesis and improves cognitive deficits in a transgenic mouse model for alzheimer's disease. **Neurodegenerative Diseases**, v. 9, n. 4, p. 187–198, 2012. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22584394>>. Acesso em: 09 jan. 2019. DOI: 10.1159/000330363
- BLAUKAT, A. et al. Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. **Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1300–1309, 1999. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/9930991/>>. Acesso em: 13 fev. 2019. DOI: 10.1021/bi981727r
- BLAUWENDRAAT, C. et al. Pilot whole-exome sequencing of a German early-onset Alzheimer's disease cohort reveals a substantial frequency of PSEN2 variants. **Neurobiology of Aging**, v. 37, p. 208, 2016. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26522186>>. Acesso em: 18 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.016.
- BONARDI, C. et al. A detailed analysis of the early context extinction deficits seen in APP<sup>sw</sup>/PS1<sup>dE9</sup> female mice and their relevance to preclinical Alzheimer's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 89–97, 2011. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440575>>. Acesso em: 16 fev. 2019. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.041
- BORCHELT, D. R. et al. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. **Neuron**, v. 19, n. 4, p. 939–945, 1997. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354339>>. Acesso em: 16 fev.2019. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80974-5.
- BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta neuropathologica**, v. 82, n. 4, p. 239–59, 1991. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759558>>. Acesso em: 14 mar.2019. DOI: doi.org/10.1007/BF00308809.
- BUTTERFIELD, A.; BOYD-KIMBALL, D. Oxidative Stress, Amyloid- $\beta$  Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 62, n. 3, p. 1345–1367, 2018. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29562527>>. Acesso em: 17 jan. 2019. DOI: 10.3233/JAD-170543.
- CABALLERO, T. et al. Consensus Statement on the Diagnosis, Management, and Treatment of Angioedema Mediated by Bradykinin. Part II. Treatment, Follow-up, and Special Situations Spanish Study Group on Bradykinin-Induced Angioedema (SGBA) (Grupo Español de Estudio del Angioedem). **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 21, n. 216, p.

422–441, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21995176>>. Acesso em: 10 jan.2019. PMID:21995176

CACABELOS, R. Diagnosis of Alzheimer’s disease: Defining genetic profiles (genotype vs phenotype). **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 94, n.165, p. 72–84, 1996. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0404.1996.tb05875.x> >. Acesso em: 21 jan. 2019. DOI: 10.1111/j.1600-0404.1996.tb05875.x

CACABELOS, R. Pharmacogenomics in alzheimer’s disease. **Methods in Molecular Biology**, v. 448, p. 213–357, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18370236> >. Acesso em: 10 fev.2019. DOI: 10.1007/978-1-59745-205-2\_10.

CALDERON-GARCIDUEÑAS, A. L.; DUYNCKAERTS, C. Alzheimer Disease. **Handb Clin Neurol**. v. 34, p. 591–601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28987180>>. Acesso em: 19 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.cger.2018.06.006

CAMPS, P.; MUNOZ-TORRERO, D. Cholinergic Drugs in Pharmacotherapy of Alzheimers Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 11–25, 2005. Disponível em: < <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2002/00000002/00000001/art00003>>. Acesso em: 17 fev. 2019. DOI: 10.2174/1389557023406638

CARVAJAL, Francisco J.; INESTROSA, Nibaldo C. Interactions of AChE with A $\beta$  Aggregates in Alzheimer’s Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. **Front Mol Neurosci**. v.4, n. 19, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3172730/>>. Acesso em: 17 fev.2019. DOI:10.3389/fnmol.2011.00019

CARMONA, S.; HARDY, J.; GUERREIRO, R. The genetic landscape of Alzheimer disease. **Handb Clin Neurol**. v.148, p.395-408, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29478590>>. Acesso em: 19 fev. 2019. DOI: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00026-0.

CHAIYANA, W.; OKONOZI, S. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. **Phytomedicine**, v. 19, n. 8–9, p. 836–839, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22510493> >. Acesso em: 10 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.phymed.2012.03.010

CICARDI, M. et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: Consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 5, p. 602–616, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673465>>. Acesso em: 10 jan. 2019. DOI: 10.1111/all.12380

COUTURE, R. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1–3, p. 161–176, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698039>>. Acesso em: 18 fev. 2019. DOI: 10.1016/S0014-2999(01)01318-8

CROUS-BOU, M. et al. Alzheimer’s disease prevention: From risk factors to early intervention. **Alzheimer’s Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <

<https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-017-0297-z>. Acesso em: 18 mar. 2019. DOI: 10.1186/s13195-017-0297-z.

D'SOUZA, I. et al. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5598–5603, 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318930>>. Acesso em: 19 fev. 2019. DOI: 10.1073/pnas.96.10.5598

DAVIGLUS, M. L. et al. Risk factors and preventive interventions for alzheimer disease: State of the science. **Archives of Neurology**, v. 68, n. 9, p. 1185–1190, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555601>>. Acesso em: 10 abr. 2019. DOI: 10.1001/archneurol.2011.100

DE FELICE, F. G. et al. A $\beta$  oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 15, p. 11590–11601, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308309>>. Acesso em: 20 jan. 2019. DOI: 10.1074/jbc.M607483200

DE FELICE, F. G. et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A $\beta$  oligomers. v. 29, n. 9, p. 1334–1347, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17403556>>. Acesso em: 19 abr. 2019. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.029. Alzheimer

DE FELICE, F. G. et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1971–1976, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188609>>. Acesso em: 16 jan. 2019. DOI: 10.1073/pnas.0809158106

DOROSTKAR, M. M. et al. Immunotherapy alleviates amyloid-associated synaptic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. **Brain: a journal of neurology**, v. 137, p. 3319–3326, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25281869>>. Acesso em: 20 abr. 2019. DOI: 10.1093/brain/awu280.

ERICKSON, M.A; BANKS, W.A. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. **J Cereb Blood Flow Metab.** v.33, n.10, p.1500-13, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921899>>. Acesso em: 12 jun. 2019. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.135.

FAIVRE, E.; HÖLSCHER, C. Neuroprotective effects of D-Ala(2)GIP on Alzheimer's disease biomarkers in an APP/PS1 mouse model. **Alzheimers Res Ther.** v.19,n.5, p.2-20, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601582>>. Acesso em: 05 jan. 2019. DOI: 10.1186/alzrt174.

FELICE, F. G. DE. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 2, p. 531–539, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561831/>>. Acesso em: 12 mar. 2019. DOI: 10.1172/JCI64595

FERREIRA, S. T.; KLEIN, W. L. The A $\beta$  oligomer hypothesis for synapse failure and

memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiol Learn Mem.** v. 96, n. 4, p. 526–543, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914486>>. Acesso em: 19 mar.2019. DOI: 110.1016/j.bbi.2017.04.008

FERGUSON, S.A; SARKAR. S.; SCHMUED, L.C. Longitudinal behavioral changes in the APP/PS1 transgenic Alzheimer's disease model. **Behav Brain Res.** v.1,n. 242, p.125-34, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295401>>. Acesso em: 12 jun.2019. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.12.055.

FIGUEIREDO, C. P. et al. Memantine Rescues Transient Cognitive Impairment Caused by High-Molecular-Weight A Oligomers But Not the Persistent Impairment Induced by Low-Molecular-Weight Oligomers. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 23, p. 9626–9634, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23739959>>. Acesso em: 19 abr. 2019. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0482-13.2013

GARCIA-ALLOZA, M. et al. Antioxidants have a rapid and long-lasting effect on neuritic abnormalities in APP/PS1 mice. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 12, p. 2058–2068, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124175>>. Acesso em: 16 mai. 2019. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.11.006

GAUTHIER, S. et al. Management of behavioral problems in Alzheimer's disease. **International Psychogeriatrics**, v. 22, n. 3, p. 346–372, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096151>>. Acesso em: 16 jan. 2019. DOI: 10.1017/S1041610209991505

GERRITSEN, A. A. J. et al. Prevalence of Comorbidity in Patients With Young-Onset Alzheimer Disease Compared With Late-Onset: A Comparative Cohort Study. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 17, n. 4, p. 318–323, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778489>>. Acesso em: 15 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.jamda.2015.11.011

GIACOBINI, E. et al. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. **J Neural Transm (Vienna)**. v.109, n.7, p.1053-65, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111443>>. Acesso em: 05mar.2019. DOI: 10.1007/s007020200089

GIMPL, G. et al. Bradykinin receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain are linked to physiological responses. **Neuroscience Letters**, v. 144, n. 1–2, p. 139–142, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1331908>>. Acesso em: 19 abr. 2019. DOI: 10.1016/0304-3940(92)90735-P

GÖBEL, K. et al. Plasma kallikrein modulates immune cell trafficking during neuroinflammation via PAR2 and bradykinin release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 1, p. 271–276, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30559188>>. Acesso em: 17 jan. 2019. DOI: 10.1073/pnas.1810020116

GOLIAS, C. et al. The kinin system-bradykinin: Biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system-bradykinin. **Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 124–128, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658795/>>. Acesso em: 13 fev. 2019. PMID: 19582206

GONG, Y. et al. Alzheimer's disease-affected brain of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. v. 100, n. 18, p. 10417–10422, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925731>>. Acesso em: 18 jan. 2019. DOI: 10417–10422.

GÖTZ, J. et al. A decade of tau transgenic animal models and beyond. **Brain Pathology**, v. 17, n. 1, p. 91–103, 2019. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925731>>. Acesso em: 10 jan. 2019. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2007.00051.x

GRALLE, M.; FERREIRA, S. T. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 1, p. 11–32, 2007. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428603>>. Acesso em: 07 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2007.02.001

HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 101–112, 2007. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245412>>. Acesso em: 14 jan. 2019. DOI: 10.1038/nrm2101

HALEY, G. E. et al. Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2, apoE, and GFAP levels in the rhesus macaque prefrontal cortex and hippocampus. **Age (Dordr)**. v.32,n.3, p. 283–296, 2010. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2926858/>>. Acesso em: 13 jun.2019. DOI: 10.1007/s11357-010-9137-9

HASEGAWA, M.; SMITH, M. J.; GOEDERT, M. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. **FEBS Letters**, v. 437, n. 3, p. 207–210, 1998. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9824291>>. Acesso em: 10 jan. 2019. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01217-4

HENEKA, M. T. et al. HHS Public Access Neuroinflammation in Alzheimer ' s Disease. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5909703/>>. Acesso em: 23 fev. 2019. DOI: /10.1016/S1474-4422(15)70016-5.

HERRERA JR, E. et al. Epidemiologic Survey of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. **Alzheimer Dis Assoc Disord**. v. 16, n. 2, p. 103–108, 2002. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040305>>. Acesso em: 18 jan.2019. DOI: 10.1097/01.WAD.0000020202.50697

HICKMAN, S. E.; ALLISON, E. K.; KHOURY, J. EL. Microglial dysfunction and defective Ab clearance pathways in aging AD mice. **J Neurosci**, v. 28, n. 33, p. 8354–8360, 2008. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701698>>. Acesso em 08 mar. 2019. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.

IFUKU, M. et al. Bradykinin-Induced Microglial Migration Mediated by B1-Bradykinin Receptors Depends on Ca<sup>2+</sup> Influx via Reverse-Mode Activity of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 48, p. 13065–13073, 2007. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18045900>>. Acesso em: 19 abr. 2019. DOI: 10.1523/jneurosci.3467-07.2007

IORES-MARÇAL, L. M. et al. Bradykinin release and inactivation in brain of rats submitted to an experimental model of Alzheimer's disease. **Peptides**, v. 27, n. 12, p. 3363–3369, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030465>>. Acesso em: 14 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.08.012

ITURRIA-MEDINA, Y. et al. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. **Nat Commun**. v.21, n.7, p.11934, 2016. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27327500>>. Acesso em: 14 fev.2019. DOI: 10.1038/ncomms11934.

JANG, H. et al. Mechanisms for the Insertion of Toxic, Fibril-like  $\beta$ -Amyloid Oligomers into the Membrane. **Chem. Theory Comput**. v. 8, n. 9, p. 822–833, 2013. Disponível em:< <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ct300916f>>. Acesso em: 05 mar.2019. DOI: 10.1038/jid.2014.371

JANKOWSKY, J. L. et al. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. **Biomolecular Engineering**, v. 17, n. 6, p. 157–165, 2001. Disponível em:< <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/co-expression-of-multiple-transgenes-in-mouse-cns-a-comparison-of-5> >. Acesso em: 19 mai. 2019. DOI: 0.1016/S1389-0344(01)00067-3

JANKOWSKY, J. L. et al. Environmental Enrichment Mitigates Cognitive Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease, **J Neurosci**. v.25, n.21, p. 5217–5224, 2005. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440804/>>. Acesso em: 16 mai.2019. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5080-04.2005

JANKOWSKY, J. L. et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue  $\beta$ -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific  $\gamma$  secretase. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 2, p. 159–170, 2004. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645205>>. Acesso em: 19 fev. 2019. DOI: /10.1093/hmg/ddh019.

JANKOWSKY, J. L.; ZHENG, H. Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 1–22, 2017. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29273078>>. Acesso em: 30 jan. 2019. DOI: 10.1186/s13024-017-0231-7.

JARVIS, B.; FIGGITT, D. P. Memantine. **Drugs Aging**, v. 20, n. 6, p. 465–476, 2003. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12710865>>. Acesso em: 15 mar. 2019. DOI: /10.1017/CBO9780511841378.077

JOSEPH JS et al. Amino acid sequence of trocarnin, a prothrombin activator from *Tropidechis carinatus* venom: its structural similarity to coagulation factor Xa. **Blood**. v.15, n.94, p.621–31, 1999. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397729>>. Acesso em: 12 fev.2019. DOI: 10.224/fnmol.19995.00333

JU, H. et al. Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. **Biochemical Journal**, v. 351, n. 1, p. 257–264, 2000. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998369>>. Acesso em: 06 fev. 2019. DOI: 10.1042/bj3510257

KADUSZKIEWICZ, H. et al. Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. **Bmj**, v. 331, n. 7512, p. 321–327, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1183129/>>. Acesso em: 12 fev. 2019. DOI: 10.1136/bmj.331.7512.321

KAPOGIANNIS, D.; MATTSON, M. P. Perturbed Energy Metabolism and Neuronal Circuit Dysfunction in Cognitive Impairment. v. 10, n. 2, p. 187–198, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3026092/>>. Acesso em: 10 mar. 2019. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70277-5

KELLY, P. et al. Restoration of cerebral and systemic microvascular architecture in APP/PS1 transgenic mice following treatment with liraglutide<sup>TM</sup>. **Microcirculation**, v. 22, n. 2, p. 133–145, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556713>>. Acesso em: 17 fev. 2019. DOI: 10.1111/micc.12186

KHAN, T. K.; ALKON, D. L. An internally controlled peripheral biomarker for Alzheimer's disease: Erk1 and Erk2 responses to the inflammatory signal bradykinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 13203–13207, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920798>>. Acesso em: 12 fev. 2019. DOI: 10.1073/pnas.0605411103

KNOBLOCH, M. et al. Oligomer-Mediated Long-Term Potentiation Impairment Involves Protein Phosphatase 1-Dependent Mechanisms. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 29, p. 7648–7653, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634359>>. Acesso em: 20 mar. 2019. DOI: 10.1523/jneurosci.0395-07

KNOBLOCH, M.; MANSUY, I. M. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. **Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 1, p. 73–82, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438727>>. Acesso em: 13 fev. 2019. DOI: 10.1007/s12035-008-8018-z

KNOPMAN, D. S. et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**. v.8, n.56, p. 1143-53, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342678>>. Acesso em: 18 fev. 2019. DOI: 10.1212/wnl.56.9.1143

KNOPMAN, D. S.; BOEVE, B. F.; PETERSEN, R. C. Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 78, n. 10, p. 1290–1308, 2003. Disponível em: < <https://pdfs.semanticscholar.org/a421/b6fa46fa44db438f3cc6c1abc807d2d26e9a.pdf> >. Acesso em: 13 mai. 2019. DOI: 10.4065/78.10.1290

KOFFIEA, R. M. et al. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. **Pnas**, v. 95, n. 11, p. 6448–6453, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228947>>. Acesso em: 13 fev. 2019. DOI: 10.1073/pnas.95.11.6448

KOHNO, T. et al. Protein-tyrosine kinase CAK $\beta$ /PYK2 is activated by binding Ca<sup>2+</sup>

/calmodulin to FERM F2  $\alpha$ 2 helix and thus forming its dimer . **Biochemical Journal**, v. 410, n. 3, p. 513–523, 2008. Disponível em:< <http://www.biochemj.org/content/410/3/513.article-info>>. Acesso em: 12 fev. 2019. DOI: 10.1042/bj20070665

LACOR, P. N. et al. A Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 796–807, 2007. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251419>>. Acesso em: 10 mai.2019. DOI: 10.1523/jneurosci.3501-06.2007

LAMBERT, M. P. et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 6448–6453, 1998. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27787/>>. Acesso em: 21 fev.2019. DOI:10.1073/PNAS.95.11.6448

LE PAGE, A. et al. Role of the peripheral innate immune system in the development of Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 107, n. 1, p. 59–66, 2018. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29275160>>. Acesso em: 12 fev.2019. DOI: 10.1016/j.exger.2017.12.019

LEEB-LUNDBERG, F. et al. International Union of Pharmacology . XLV . Classification of the Kinin Receptor Family : from Molecular Mechanisms to Pathophysiological. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 27–77, 2005. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734727>>. Acesso em: 13 mar. 2019. DOI: 10.1124/pr.57.1.2.27

LE MOS, M. T. R. et al. Role of kinin B1 and B2 receptors in memory consolidation during the aging process of mice. **Neuropeptides**, v. 44, n. 2, p. 163–168, 2010. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060587>>. Acesso em: 12 mai. 2019. DOI: 10.1016/j.npep.2009.12.006

LI, Y. et al. Role of amyloid  $\beta$  protein receptors in mediating synaptic plasticity. **Biomedical Reports**, v. 6, n. 4, p. 379–386, 2017. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5374942/>>. Acesso em: 12 fev. 2019. DOI: 10.3892/br.2017.863

LI, Z. et al. Immunohistochemical localization of kininogen in rat spinal cord and brain. **Experimental Neurology**, v. 159, n. 2, p. 528–537, 1999. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488699971650>>. Acesso em: 05 jun.2019. DOI: 10.1006/exnr.1999.7165

LIEBMANN, C. et al. Dual bradykinin B2 receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells: activation of protein kinase C is counteracted by a GS-mediated stimulation of the cyclic AMP pathway. **Biochemical Journal**, v. 313, n. 1, p. 109–118, 1996. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546671>>. Acesso em: 12 mar. 2019. DOI:10.1042/bj3130109



LIEBMANN, C.; BOHMER, F. Signal Transduction Pathways of G Protein-coupled Receptors and Their Cross-Talk with Receptor Tyrosine Kinases: Lessons from Bradykinin Signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 911–943, 2000. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911023>>. Acesso em: 12 mar. 2019. DOI: 10.2174/0929867003374589

LIN, G. G.; SCOTT, J. G. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. **Biol Psychiatry**, v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951455> >. Acesso em: 12 fev. 2019. DOI: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012.

LIU CC, KANEKIYO T, XU H, B. G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. **Nat Rev Neurol.**, v. 9, n. 2, p. 106–118, 2013. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296339>>. Acesso em: 14 mar. 2019. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.263

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: Therapeutic perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 845–852, 2004. Disponível em:< <https://www.nature.com/articles/nrd1522>>. Acesso em: 18 mar. 2019. DOI: 10.1038/nrd1522

MCKHANN, G.M.et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.** v.7, n.3, p.263-9, 2011.Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514250>>. Acesso em: 07 mar.2019. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.005

MENDEZ, M. F. Early-onset Alzheimer disease and its variants. **Continuum (Minneapolis, Minn)**, v. 25, n. 1, p. 34–51, 2019. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30707186>>. Acesso em: 03 jun. 2019.DOI: 10.1212/CON.0000000000000687

MINOGUE, A. M. et al. Age-associated dysregulation of microglial activation is coupled with enhanced blood-brain barrier permeability and pathology in APP/PS1 mice. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 6, p. 1442–1452, 2014. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24439957> >.Acesso em: 03 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.026

MONTAGNE, A.; ZHAO, Z.; ZLOKOVIC, B. V. Alzheimer's disease: a matter of blood–brain barrier dysfunction? **J. Exp. Med.** v. 214, p.3151–3169, 2017). Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29061693> >. Acesso em: 10 jan. 2019. DOI: 10.1084/jem.20171406

MOREAU, M. E. et al. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 6–38, 2005. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177542>>. Acesso em: 14 fev. 2019. DOI: 10.1254/jphs.srj05001x

MORRIS, J. C. et al. APOE Predicts A $\beta$  but not Tau Alzheimer's Pathology in Cognitively Normal Aging. **Annals of neurology**, v. 67, n. 1, p. 122–131, 2010. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20186853>>. Acesso em: 15 mar. 2019. DOI:

10.1002/ana.21843.

NELSON, A. R. et al. Neurovascular Dysfunction and Neurodegeneration in Dementia and Alzheimer's disease. v. 118, n. 24, p. 6072–6078, 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26705676>>. Acesso em: 16 abr. 2019. DOI: 10.1002/cncr.27633

NELSON, P. T. et al. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. v. 71, n. 5, p. 11–36, 2012. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487856>>. Acesso em: 12 mai.2019. DOI: 10.1097/NEN.0b013

NEU, S. C. et al. Apolipoprotein E Genotype and Sex Risk Factors for Alzheimer's Disease. **JAMA neurology**, v. 74, n. 10, p. 1178, 2017. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846757>> Acesso em: 14 abr. 2019. DOI: 10.1001/JAMANEUROL.2017.2188

NICOLAS, G. et al. Screening of dementia genes by whole-exome sequencing in early-onset Alzheimer disease: Input and lessons. **European Journal of Human Genetics**, v. 24, n. 5, p. 710–716, 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26242991>>. Acesso em: 14 mar. 2019. DOI: 10.1038/ejhg.2015.173

NIMMIRICH, V. et al. Amyloid Oligomers (A 1-42 Globulomer) Suppress Spontaneous Synaptic Activity by Inhibition of P/Q-Type Calcium Currents. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 4, p. 788–797, 2008. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216187>>. Acesso em: 12 fev.2019. DOI: 10.1523/jneurosci.4771-07.2008

NIWA, K. et al. Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 1, p. 315–323, 2002. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063304>>. Acesso em: 14 fev.2019. DOI: 10.1152/ajpheart.00022.2002

NIWA, H. et al. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. **Mol. Cell. Biol.** v. 22,p. 1526-1536, 2002. Disponível em:<<https://mcb.asm.org/content/22/5/1526>>. Acesso em: 12 mar.2019. DOI: 10.1152/ajpheart.00022.2002

O'LEARY, T.P; BROWN, R.E. Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. **Behav Brain Res.** v.19, n.201, p.120-7,2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428625>>. Acesso em: 12 abr.2019. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.01.039.

PILLAT, M. M. et al. Bradykinin Promotes Neuron-Generating Division of Neural Progenitor Cells via ERK Activation. **Journal of Cell Science**, v.15; n.129, p.3437-48. 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27528403>>. Acesso em: 16 mar.2019. DOI: 10.1242/jcs.192534

PILLAY, N. S.; KELLAWAY, L. A.; KOTWAL, G. J. Early detection of memory deficits and memory improvement with vaccinia virus complement control protein in an Alzheimer's disease model. **Behavioural Brain Research**, v. 192, n. 2, p. 173–177, 2008. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18490064>>. Acesso em: 12 mar.2019. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.03.038

REES, T.M et al. Memory deficits correlating with acetylcholinesterase splice shift and amyloid burden in doubly transgenic mice. **Curr Alzheimer Res.** v.2, n.3,p.291-300, 2005. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15974894>>. Acesso em: 15 abr.2019. DOI: 10.3389/fnmol.2005.00333.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 329–344, 2010. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107219>>. Acesso em: 16 mar.2019. DOI: 10.1056/NEJMra040223

RABINOVICI, B. G. D. Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis)*. v.25, n1, p.14-33, 2019. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30707185>>. Acesso em: 12 mar. 2019. DOI: 10.1212/CON.0000000000000700

RACCHI, M. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: Novel activities of old molecules.

**Pharmacological Research**, v. 50, n. 4, p. 441–451, 2004. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304241>>. Acesso em: 18 mar. 2019. DOI: 10.1016/j.phrs.2003.12.027

RAIDOO, D. M.; BHOOLA, K. D. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 79, n. 2, p. 105–127, 1998. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749879>>. Acesso em: 18 mar. 2019. DOI: 10.1016/S0163-7258(98)00011-4

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins. *Pharmacol Rev.* v.32, n.1,p.1-46, 1994. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7015371>>. Acesso em: 17 mar.2019. PMID: 7015371

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. v. 3132, n. 4, p. 78–85, 2015. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398425>>. Acesso em: 14 mar. 2019. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.12.024

ROBERSON, E.D; MUCKE L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. **Science.** v.3, n. 314, p.781-4,2006. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082448>>. Acesso em: 19 mar. 2019. DOI: 10.1126/science.1132813

ROGERS, S. L. et al. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. **Dementia**, n.7, v. 6, p.293-303, 1996. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915035>>. Acesso em: 17 mar.2019. DOI: 10.1212/WNL.50.1.136.

ROJO, L. E. et al. Neuroinflammation: Implications for the Pathogenesis and Molecular Diagnosis of Alzheimer's Disease. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 1, p. 1–16, 2008. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18067990>>. Acesso em: 18 mar. 2019. DOI: 10.1016/j.arcmed.2007.10.001

ROWLAND, H. A.; HOOPER, N. M.; KELLETT, K. A. B. Modelling Sporadic Alzheimer's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 12, p. 2179–2198, 2018. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30387070>>. Acesso em: 12 mar.2019. DOI: 10.1007/s11064-018-2663-z

ROY, K. K.; DIXIT, A.; SAXENA, A. K. An investigation of structurally diverse carbamates for acetylcholinesterase (AChE) inhibition using 3D-QSAR analysis. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 27, n. 2, p. 197–208, 2008. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515163>>. Acesso em: 18 mar.2019. DOI: 10.1016/j.jmgm.2008.04.006

RUAN, L. et al. Amyloid Deposition and Inflammation in APPswe / PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer ' s Disease. **Curr Alzheimer Res**. v.6, n.6, p.531-40. 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747158>>. Acesso em: 16 abr.2019. PMID: 19747158

SABATINI, F. et al. Bradykinin-induced asthmatic fibroblast/myofibroblast activities via bradykinin B2 receptor and different MAPK pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 710, n. 1–3, p. 100–109, 2013. Disponível em:<

[europepmc.org/abstract/med/23588115](http://europepmc.org/abstract/med/23588115)>. Acesso em: 17 mar.2019. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.048

SALLUSTO, F.; LARONI, A. T-cell trafficking in the central nervous system. **Immunological Reviews**, v. 248, p. 216–227, 2012. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22725964>>. Acesso em: 19 jan. 2019. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01140.x.

SAMADI, A. et al. Multipotent drugs with cholinergic and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. I. Synthesis, biological assessment, and molecular modeling of simple and readily available 2-aminopyridine-, and 2-chloropyri.

**Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 5861–5872, 2010. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656495>>. Acesso em:19 fev.2019. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.06.095

SAVONENKO, A. et al. Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. **Neurobiol Dis**. v.18, n.3,p.602-17, 2005. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755686>>. Acesso em: 17 mar.2019.

SCHMIDT, R. et al. EFNS-ENS/EAN Guideline on concomitant use of cholinesterase inhibitors and memantine in moderate to severe Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 22, n. 6, p. 889–898, 2015. Disponível em:<

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25808982>>. Acesso em: 18 mar. 2019. DOI: 10.1111/ene.12707

SELKOE, D. J. Alzheimer ' s Disease Is a Synaptic Failure. v. 25, p. 789–792, 2002. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399581>>. Acesso em: 19 abr.2019. DOI: 10.1126/science.1074069

SELKOE DJ. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nat Cell Biol.** v.6, n.11, p.1054-61, 2004. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516999>>. Acesso em: 18 mar.2019.DOI: 10.1038/ncb1104-1054

SHANKAR, G. M.; WALSH, D. M. Alzheimer's disease: Synaptic dysfunction and A $\beta$ . **Molecular Neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2009. Disponível em:< <https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.../1750-1326-4-48>>. Acesso em: 09 mar.2019. DOI: 10.1186/1750-1326-4-48

SHEN, L. et al. Amelioration of cognitive impairments in APPswe/PS1dE9 mice is associated with metabolites alteration induced by total salvianolic acid. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–25, 2017. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28358909>>. Acesso em: 17 jan.2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0174763

ŠIMIĆ, G. et al. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. **Biomolecules**, v. 6, n. 1, p. 2–28, 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26751493>>. Acesso em: 18 mai.2019. DOI: /10.3390/biom6010006

SHI,Y; HOLTZMAN, D.M. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight.Nat Rev Immunol. v.18,n.12, p.759-772, 2018. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30140051>>> Acesso em: 18 mai.2019. DOI: 10.1038/s41577-018-0051-1.

SOCHOCKA, M.; DINIZ, B. S.; LESZEK, J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 8071–8089, 2017. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889895>>. Acesso em: 18 mai.2019.DOI: 10.1007/s12035-016-0297-1

SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J. O<sub>2</sub> Reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. **NIH Public Access**. v. 259, n. 30, p. 3921–3932, 2008. Disponível em:< <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2008/dt/b800799c/>>. Acesso em: 18 mar.2019. DOI: 10.1039/b800799c.

STERANKA, L. R. et al. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 9, p. 3245–3249, 1988. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2896357>>. Acesso em: 10mar.2019.DOI: 10.1073/pnas.85.9.3245

STEWART, S. M. et al. Prospective analysis of stress and academic performance in the first and second year of medical school. **Medical Education**, p. 243–250, 1999. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10336754>>. Acesso em: 19 mai.2019. PMID:

10336754.

STREIT, W. J.; MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. T. Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v. 1, p. 1–4, 2004. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC509427/>>. Acesso em: 18 abr.2019. DOI: 10.1186/1742-2094-1-14

SZEKELY, C. A.; ZANDI, P. P. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Alzheimers Disease: The Epidemiological Evidence. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 132–139, 2012. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205647>>. Acesso em: 19 mar.2019. DOI: 10.2174/187152710791012026

TERRY, V.; BUCCAFUSCO, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. n. 306, v.3, p.821-827, 2003. Disponível em:<<http://jpet.aspetjournals.org/content/306/3/821>>. Acesso em: 18 abr. 2019. DOI: 10.1124/jpet.102.041616

THORNTON, E. et al. Kinin receptor antagonists as potential neuroprotective agents in central nervous system injury. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 6598–6618, 2010. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877247>>. Acesso em: 10 mar.2019. DOI: 10.3390/molecules15096598.

TOBINICK, E. Perispinal Etanercept for Treatment of Alzheimer ' s Disease. **Curr Alzheimer Res**. v.4, n.5,p.550-552, 2007. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220520>>. PMID: 18220520

TOGO, T. et al. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. **Journal of Neuroimmunology**, v. 124, n. 1–2, p. 83–92, 2002. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958825>>. Acesso em: 10 mai.2019. DOI: 10.1016/S0165-5728(01)00496-9

TOWN, T.; NIKOLIC, V.; TAN, J. The microglial “activation” continuum: From innate to adaptive responses. **Journal of Neuroinflammation**, v. 2, p. 1–10, 2005. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1298325>>. Acesso em: 09 fev.2019. DOI: 10.1186/1742-2094-2-24.

TRUJILLO, C. A. et al. Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 53, p. 44046–44061, 2012. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132855>>. Acesso em:19 mar.2019. DOI: 10.1074/jbc.M112.407197

TURNER, R. S. Alzheimer's disease. **Medicine (Spain)**, v. 26, n. 74, p. 499–506, 2006. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30878411>>. Acesso em: 10 abr.2019. DOI: 10.1016/j.med.2019.03.012

ULRICH, J. et al. Senile plaques: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex. **Acta Neuropathologica**, v. 80,

n. 6, p. 624–628, 1990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1703383>>. Acesso em: 10 mai.2019. DOI: 10.1007/BF00307630

VÉGH, M. J. et al. Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974208>>. Acesso em: 19 mai.2019. DOI: 10.1186/s40478-014-0076-z

VIEL, T. A. et al. Increases of kinin B1 and B2 receptors binding sites after brain infusion of amyloid-beta 1-40 peptide in rats. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 12, p. 1805–1814, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570564>>. Acesso em: 10 mai.2019. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.019

VIEL, T. A.; BUCK, H. S. Kallikrein-Kinin System Mediated Inflammation in Alzheimer's Disease In Vivo. **Current Alzheimer Research**, p. 59–66, 2011. Disponível em: < [www.eurekaselect.com/node/87518/?trendmd-shared=4](http://www.eurekaselect.com/node/87518/?trendmd-shared=4)>. Acesso em: 18 mar.2019. DOI: 10.2174/156720511794604570

VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 2, p. 183–206, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25604547>>. Acesso em: 19 mai.2019. DOI: 10.1007/s00401-015-1386-3

VOM BERG, J. et al. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. **Nature Medicine**, v. 18, n. 12, p. 1812–1819, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178247>>. Acesso em: 19 mai.2019. DOI: 10.1038/nm.2965

WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochemistry International**, v. 26, n. 1, p. 1–16, 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7787759>> DOI: 10.1016/0197-0186(94)00114-A

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull.** v.83, n.3, p.482-504, 1976. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582919>>. Acesso em: 12 mar.2019. PMID: 17582919

WEBSTER, S. J. et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. APR, p. 1–23, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24795750>>. Acesso em: 28 mar.2019. DOI:10.3389/fgene.2014.00088

WEI, W. et al. Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 2, p. 190–196, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20037574>>. Acesso em: 13 maio.2019 DOI: 10.1038/jid.2014.371

WIRTH, K. et al. DesArg9- D\_Arg[Hyp3, Thi5, D-Tic7, Oic8]\_bradykinin (desArg10-[Hoe140]) is a potent bradykinin B1 receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.** v.205, p. 217-218,1991. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1667388>>. Acesso em:09 fev.2019. DOI: 10.1016/0014-2999(91)90824-a

WONG, C. W. Pharmacotherapy for Dementia: A Practical Approach to the Use of Cholinesterase Inhibitors and Memantine. **Drugs and Aging**, v. 33, n. 7, p. 451–460, 2016. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27154396>>. Acesso em:19 mar.2019. DOI: 10.1007/s40266-016-0372-3

XING, M.; TAO, L.; INSE, P. A. Role of extracellular kinase and PKC , in cytosolic PLAZ activation by bradykinin in MDCK-D1 cells. p. 380–387, 1997. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142865>>. Acesso em: 18 mar.2019. DOI: 10.1152/ajpcell.1997.272.4.C1380

YASUHARA, O.; WALKER, D. G.; MCGEER, P. L. Hageman factor and its binding sites are present in senile plaques of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 654, n. 2, p. 234–240, 1994. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899394904847>>. Acesso em:18 abr.2019.DOI: 10.1016/0006-8993(94)90484-7

ZAMOLODCHIKOV, D. et al. Activation of the factor XII-driven contact system in Alzheimer's disease patient and mouse model plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. 4068–4073, 2015. Disponível em:<<https://www.pnas.org/content/112/13/4068>>. Acesso em: DOI: 10.1073/pnas.1423764112

ZHANG, W. W. et al. Peripheral cholinceptor antagonist anisodamine counteracts cholinergic adverse effects and facilitates cognitive amelioration of rivastigmine. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 12, p. 1643–1649, 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756370>>. Acesso em: 18 mar.2019.DOI: 10.1007/s00702-009-0297-7

ZHANG, Y. et al. APP processing in Alzheimer's disease. **Molecular Brain**, v. 4, n. 3, p. 222–232, 2011. Disponível em:<<https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-6606-4-3>>. Acesso em: 19 abr.2019.DOI: 10.1080/13607860410001669750

ZHAO, W. Q. et al. MAP kinase signaling cascade dysfunction specific to Alzheimer's disease in fibroblasts. **Neurobiology of Disease**, v. 11, n. 1, p. 166–183, 2002. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996102905206>>. Acesso em: 18 mar.2019.DOI: 10.1006/nbdi.2002.0520

ZHU, S. et al. The role of neuroinflammation and amyloid in cognitive impairment in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 23, n. 4, p. 310–320, 2017. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28191738>>. Acesso em: 19 mar.2019. DOI: 10.1111/cns.12677



ZLOKOVIC, B. V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. **Neuron**, v. 57, n. 2, p. 178–201, 2008. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215617>>. Acesso em: 18 mar.2019. DOI: 0.1016/j.neuron.2008.01.003

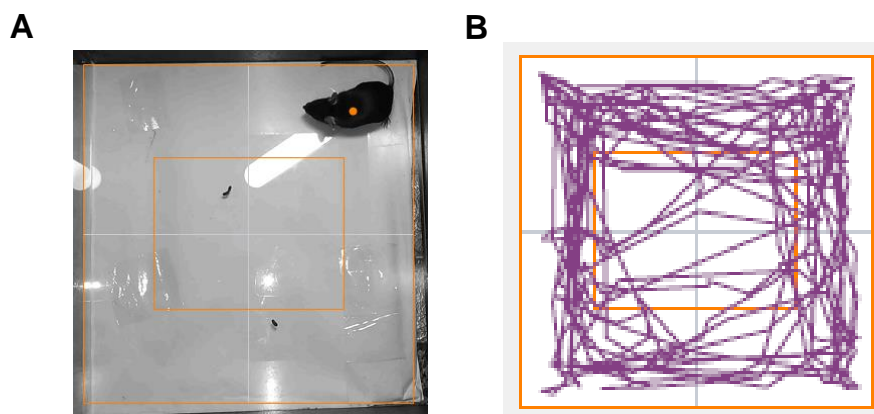
ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 723–738, 2011. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048062>>. Acesso em: 19 abr.2019. DOI: 10.1038/nrn3114.Neurovascular

## ANEXO I

### 1 Análise de Campo Aberto

O sistema de monitoramento de atividades em campo aberto avalia de forma abrangente os níveis de atividade locomotora e comportamental de camundongos, de modo especial a avaliação da ansiedade, sendo um dos testes comportamentais primários (WALSH; CUMMINS, 1976). Além disso, ressalta-se que testes comportamentais podem ser influenciados por múltiplos fatores externos. Por exemplo, o teste de campo aberto pode ser influenciado por ansiedade, patologias, o ritmo circadiano, os fatores ambientais e a genética (WALSH; CUMMINS, 1976). Dessa forma, constata-se imperativo conduzir essa análise de maneira padronizada com um ambiente controlado.

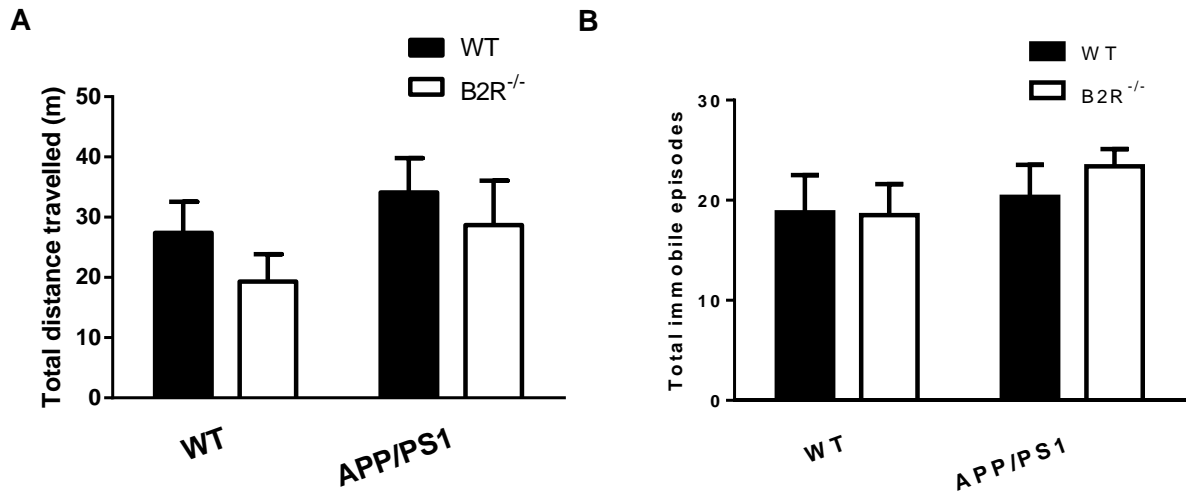
Realizamos testes de campo aberto a fim de (i) avaliar a atividade exploratória e locomotora dos animais em estudo, fato que poderia influenciar nos demais testes e resultados e (ii) avaliar parâmetros de ansiedade em animais nocaute para B2R. Inicialmente, cada camundongo foi posicionado no centro de uma caixa (30 x 30cm e 15 cm de altura) e permaneceu nela por 5 minutos (75). As sessões foram filmadas e as distâncias que os animais percorreram, bem como o tempo de imobilidade foram mensurados. As análises foram realizadas pelo *software* ANY-maze conforme mostrado na Figura 1.1.



**Figura 1.1:** Representação do Teste de Campo Aberto para evidenciar possíveis alterações locomotoras. A delimitação da zona da periferia e central é mostrado. Os dados foram analisados através do *software* ANY-maze.

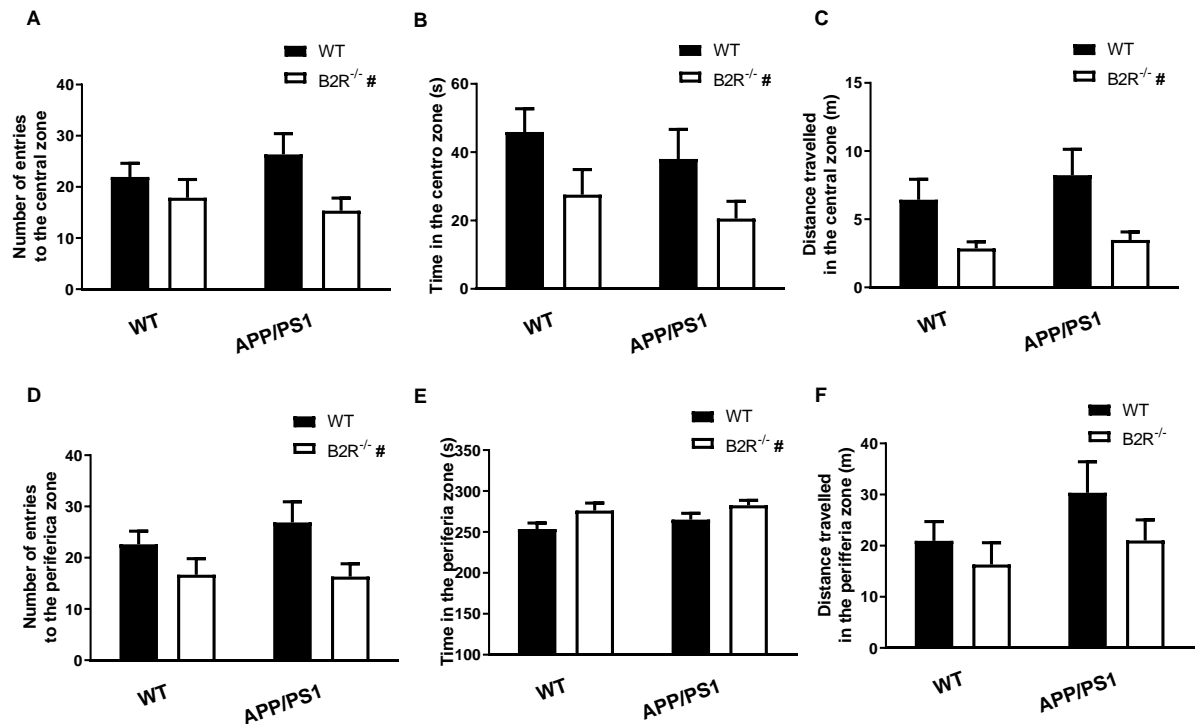
Como pode ser visto na Figura 1.2, todos os grupos tiveram atividade locomotora típica, na qual nenhum grupo experimental locomoveu-se por maiores ou menores distâncias em

relação com controle, bem como, nenhum grupo experimental apresentou diferença em relação a episódios de imobilidade, como esperado.



**Figura 1.2.** Análise da Atividade Locomotora em animais modelo da DA tipo familiar. Teste de Campo Aberto para evidenciar possíveis alterações locomotoras em camundongos selvagens (WT), B2R<sup>-/-</sup>, APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> (representado como APP/PS1) e APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>/B2R<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos como média ± SEM. (n = 6-8) e analisados em GraphPad Prism 6.0 por ANOVA de 2 vias.

Em sequência avaliamos vários parâmetros distinguindo a zona central (Figura 1.3 A, B e C) e a zona periférica (Figura 1.3D, E e F) do campo aberto. Através da ANOVA de duas vias, identificamos que os animais com o genótipo B2R<sup>-/-</sup> apresentam uma grande redução no número de entradas (Figura 1.3A), no tempo de permanência (Figura 1.3B) e na distância percorrida (Figura 1.3C) na zona central. Assim, essa grande diminuição para entrar, permanecer e locomover-se na zona central do aparato, sugere que a ausência do B2R desencadeia um comportamento ansioso em camundongos. Como esperado, os camundongos nocauteados para o B2R permaneceram um tempo maior na zona periférica do aparato (Figura 1.3E), visto que esta confere uma sensação de maior segurança ao animal com comportamento ansioso.



**Figura 1.3:** Avaliação de parâmetros de Ansiedade em aparato de Campo Aberto em camundongos selvagens (WT), B2R<sup>-/-</sup>, APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> (representado como APP/PS1) e APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup>/B2R<sup>-/-</sup>. Os dados são apresentados como a média  $\pm$ SEM (n = 6-8) e foram analisados através do *software* ANY-maze e GraphPad Prism 6.0 por ANOVA de 2 vias.

Entretanto, esses dados demonstram ser diferentes dos resultados encontrados da literatura. Amaral e colaboradores (2010) avaliaram parâmetros de ansiedade no aparato do campo aberto não demonstrou qualquer alteração desse parâmetro em animais nocaute de B2R. Além disso, Ferreira e colaboradores (2013) em outro aparato capaz de avaliar ansiedade, labirinto em cruz elevado, utilizou a administração do antagonista HOE-140 e esse também apresentou efeito no comportamento ansiogênico. Nesse sentido, mais testes devem ser realizados afim de confirmar comportamento tipo ansioso dos animais nocaute de B2R.