

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**MODULAÇÃO DO SISTEMA DAS POLIAMINAS E  
BLOQUEIO SELETIVO DE CORRENTES DE K<sup>+</sup> DO TIPO A  
REVERTE O DANO COGNITIVO INDUZIDO POR PEPTÍDEO  
β-AMILOIDE<sub>25-35</sub>**

**TESE DE DOUTORADO**

**GUILHERME MONTEIRO GOMES  
Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**MODULAÇÃO DO SISTEMA DAS POLIAMINAS E  
BLOQUEIO SELETIVO DE CORRENTES DE K<sup>+</sup> DO TIPO A  
REVERTE O DANO COGNITIVO INDUZIDO POR PEPTÍDEO  
β-AMILOIDE<sub>25-35</sub>**

**Guilherme Monteiro Gomes**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau

**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Maribel A. Rubin**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Monteiro Gomes, Guilherme  
MODULAÇÃO DO SISTEMA DAS POLIAMINAS E BLOQUEIO  
SELETIVO DE CORRENTES DE K<sup>+</sup> DO TIPO A REVERTE O DANO  
COGNITIVO INDUZIDO POR PEPTÍDEO BETA-AMILOIDE25-35 /  
Guilherme Monteiro Gomes.-2013.  
124 p.; 30cm

Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2013

1. Poliaminas 2. Doença de Alzheimer 3. Receptor NMDA  
4. Phoneutria Nigreventer 5. Correntes de K<sup>+</sup> do tipo A  
I. Antonello Rubin, Maribel II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de  
Doutorado**

**MODULAÇÃO DO SISTEMA DAS POLIAMINAS E  
BLOQUEIO SELETIVO DE CORRENTES DE K<sup>+</sup> DO TIPO A  
REVERTE O DANO COGNITIVO INDUZIDO POR PEPTÍDEO  
β-AMILOIDE<sub>25-35</sub>**

Elaborada por  
**Guilherme Monteiro Gomes**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Maribel Antonello Rubin (Orientadora)

---

Prof. Dr. Lisiane de Oliveira Porciúncula (UFRGS)

---

Prof. Dr. Roselei Fachinetto (UFSM)

---

Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira (UFSM)

---

Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes (UFSM)

Santa Maria, 18 de novembro de 2013

Às pedras no caminho, aos muros caídos,  
ideias pré-concebidas.

Ao povo brasileiro.

## **Agradecimentos**

(ou como cheguei até aqui)

Com o intuito de dar bom uso a essa página, me permito aqui, senão como memória, mas como agradecimento também, relatar os passos que me trouxeram até aqui. Aqueles aqui citados são da minha mais alta estima, e peço perdão aos envolvidos que, por falha de minha memória, não foram citados, pois também foram importantes para realização deste.

Este trabalho começou as escondidas, idealizada e concebida nos seus primeiros passos por mim e Gerusa Dalmolin. Um aporte justo e necessário, Gerusa esteve presente em todos os passos deste trabalho, da concepção a execução de ideias. Sem sua orientação, talvez pouco restaria para aqui escrever. Da professora Maribel recebi o aval e a liberdade para execução do projeto, e assim a agradeço.

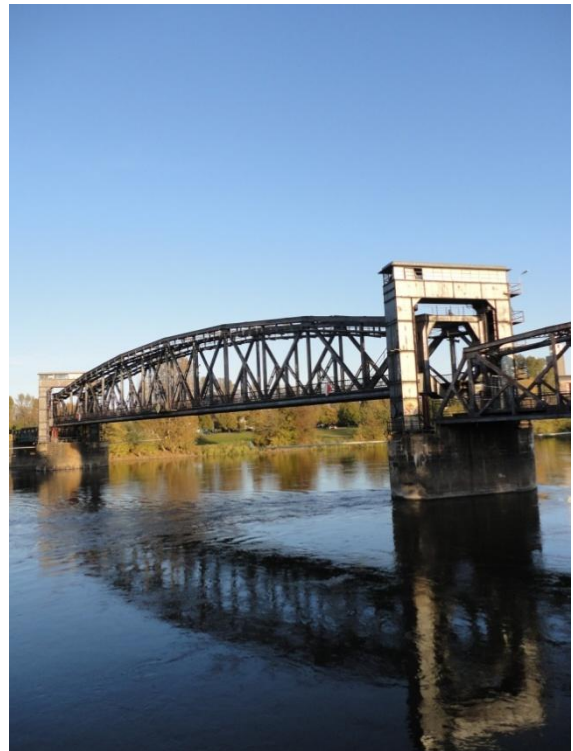
Minha ambição era fazer um trabalho relevante, e cruzar fronteiras foi fundamental. Contei com o apoio irrestrito do professor Carlos Mello, que com primasia ajustou as engrenagens (minhas e do trabalho) para um voo maior, até o velho continente. Na Alemanha, encontrei no Laboratório de Neuroplasticidade, dirigido pelo Dr. Michael R. Kreutz, um ambiente propício para continuidade deste trabalho, e no Instituto Leibniz de Neurobiologia, uma comunidade científica vibrante. Com a ajuda de Anna Karpova e Julia Bär, aprendi novas técnicas (as quais me custaram tempo dominar). Foram muitas transfecções sem sucesso, muitas células mortas, muitas horas no microscópio, mas perseverar era o único caminho. Aqui faço a ressalva, pois se os experimentos lá realizados e aqui apresentados possuem falhas conceituais, elas são de mais ninguém, senão minhas. Sou grato a DAAD que possibilitou esta estada na Alemanha, de crescimento científico imensurável. Agradeço aos colegas do Nplast pela acolhida desde os primeiros momentos.

Não poderia deixar de mencionar a generosa contribuição dos professores Marcus Vinicius Gomez (Universidade Federal de Minas Gerais) e Juliano Ferreira (Universidade Federal de Santa Maria/ Universidade Federal de Santa Catarina), que viabilizaram o trabalho realizado com a toxina Tx3-1.

Também generosos foram os aportes financeiros dispensados pelas agências de fomento, que foram cruciais e possuem meu mais alto apreço.

Por fim agradeço o apoio da minha família, que entendeu e aceitou minhas escolhas, e me deram o carinho e suporte necessário para chegar até o fim desta jornada.

Alguns percausos retardaram a finalização deste trabalho. Lutei para superá-los e assim apresento esta tese como resultado de quatro anos intensos, de aprendizado e dedicação.



*Von so weit her bis hierhin.*

*Von hier aus noch viel weiter.*

(de muito longe até aqui)

(daqui para muito mais longe ainda)

Maurizio Nannucci



## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

### **MODULAÇÃO DO SISTEMA DAS POLIAMINAS E BLOQUEIO SELETIVO DE CORRENTES DE K<sup>+</sup> DO TIPO A REVERTE O DANO COGNITIVO INDUZIDO POR PEPTÍDEO $\beta$ -AMILOIDE<sub>25-35</sub>**

AUTOR: GUILHERME MONTEIRO GOMES

ORIENTADOR: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de novembro de 2013.

O peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), reconhecido como agente tóxico na Doença de Alzheimer (DA) é implicado como causador de danos cognitivos e sinápticos, apesar de os mecanismos não serem completamente compreendidos. O envolvimento do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) na DA é sugerido, visto que o seu bloqueio atenua alguns aspectos neuropatológicos da DA. Nesse contexto, tem sido demonstrado que as poliaminas, como espermidina e espermina, moduladores positivos do receptor NMDA, possuem níveis e síntese elevada tanto no cérebro de pacientes com DA como em preparações *in vitro* utilizando o peptídeo  $A\beta$ . Neste estudo demonstrou-se que a modulação do sistema das poliaminas, através do bloqueio do seu sítio de ligação no receptor NMDA por arcaína (0,02 nmol/sítio), traxoprodil (0,002 nmol/sítio) ou da inibição de sua síntese por DFMO (2,7 nmol/sítio), reverte o déficit cognitivo induzido pela injeção de  $A\beta_{25-35}$  em camundongos testados na tarefa de reconhecimento de objetos. A ativação do sítio de ligação das poliaminas em receptores NMDA extrassinápticos pode subjazer o déficit cognitivo de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$ , visto que a incubação de culturas primárias de neurônios hipocâmpais com espermidina (400  $\mu$ M), NMDA (200  $\mu$ M) ou  $A\beta_{25-35}$  (10  $\mu$ M) aumenta o acúmulo nuclear de jacob, um marcador de ativação de receptores NMDA extrassinápticos, de maneira significativa. Ademais, traxoprodil (4 nM), arcaína (4  $\mu$ M) ou DFMO (5  $\mu$ M) bloquearam o acúmulo nuclear de jacob induzido por  $A\beta$ . A ativação de receptores NMDA extrassinápticos em neurônios leva a simplificação da citoarquitetura neuronal e a diminuição de contatos sinápticos. Aqui demonstrou-se que a incubação de culturas de neurônios hipocâmpais com traxoprodil (4 nM), arcaína (4  $\mu$ M) ou DFMO (5  $\mu$ M) reverte as alterações na densidade e morfologia de espinhas dendríticas induzido pela incubação com  $A\beta_{25-35}$ . Ainda, também avaliou-se o envolvimento de correntes de K<sup>+</sup> do tipo A no déficit cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de  $A\beta_{25-35}$ . A administração de Tx3-1 (3 – 100 pmol/sítio), um bloqueador seletivo de correntes I<sub>A</sub>, reverteu o prejuízo de memória de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$  e testados na tarefa de reconhecimento de objetos. A reversão dos danos cognitivos e sinápticos induzidos por  $A\beta_{25-35}$  através da modulação do sistema das poliaminas sugere a estimulação do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, possivelmente extrassináptico, como um dos mecanismos por trás do déficit cognitivo induzido pelo peptídeo  $A\beta$ .

**Palavras-chave:** Poliaminas. Memória. Receptor NMDA extrassináptico. Reconhecimento de objetos. Espermidina. Traxoprodil. Arcaína. DFMO.

## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
*Graduation Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry*  
*Federal University of Santa Maria*

### **MODULATION OF POLYAMINE SYSTEM AND BLOCKADE OF A-TYPE K<sup>+</sup> CURRENTS COUNTERACTS $\beta$ -AMYLOID<sub>25-35</sub>-INDUCED COGNITIVE DEFICITS**

AUTHOR: GUILHERME MONTEIRO GOMES

ADVISOR: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Place and date of presentation: Santa Maria, November, 18<sup>th</sup> 2013

In Alzheimer's disease (AD),  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) has been linked with synaptic loss and cognitive dysfunction, albeit the precise mechanism remains unknown. An involvement of N-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDAR) in AD is proposed, since its inhibition attenuates some aspects of AD's neuropathology. In this regard, polyamines, like spermidine and spermine, positive modulators of NMDARs, have been shown to have both concentration and synthesis increased by  $A\beta$ . Using the novel object recognition task we showed that negative modulation of polyamine system, been trough blockade of its binding site at NMDAR by arcaine (0.02 nmol/site), traxoprodil (0.002 nmol/site), or inhibition of polyamine synthesis by DFMO (2.7 nmol/site), reverses  $A\beta_{25-35}$ -induced memory impairment in mice. The activation of polyamine binding site at NMDAR located at extrasynaptic sites might underlie the cognitive deficits of  $A\beta_{25-35}$ -treated mice, since incubation of hippocampal neuron cultures with spermidine (400  $\mu$ M) or  $A\beta_{25-35}$  (10  $\mu$ M) significantly increased nuclear accumulation of jacob protein, a marker of extrasynaptic NMDAR activation. Moreover, traxoprodil (4nM), arcaine (4  $\mu$ M) or DFMO (5  $\mu$ M) blocked the  $A\beta$ -induced jacob nuclear translocation. Activation of extrasynaptic NMDAR in neurons leads to striping of synaptic contacts and simplification of neuronal cytoarchitecture. Incubation of hippocampal neuron cultures with traxoprodil (4 Nm), arcaine (4  $\mu$ M) or DFMO (5  $\mu$ M) reversed the deleterious effects of  $A\beta_{25-35}$  on dendritic spine number and spine morphology. We also evaluated the involvement of A-type K<sup>+</sup> currents on the  $A\beta_{25-35}$ -induced memory impairment. Administration of Tx3-1 (3 – 100 pmol/site), a selective I<sub>A</sub> blocker, restored memory of mice injected with  $A\beta_{25-35}$  and tested on the novel object recognition task The reversal of memory impairment and the protective effect on dendritic spine alterations exerted by the modulators of the polyamine system suggest the polyamine binding site at extrasynaptic NMDAR a potential player in  $A\beta$ -induced cognitive deficit.

**Keywords:** Poliamines. Memory. Extrasynaptic NMDA receptors,  $\beta$ -amiloid peptide. Novel object recognition task. Spermidine. Arcaine. Traxoprodil. DFMO

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processamento proteolítico da proteína precursora amiloide (APP).....	16
Figura 2 - Classificação morfológica de espinhas dendríticas.....	19
Figura 3 - A via de sinalização da proteína jacob decodifica no núcleo a localização sináptica ou extrassináptica da ativação do NMDA.....	26
Figura 4 - Estrutura química de três poliaminas endógenas.....	24
Figura 5 - Rotas de metabolismo e interconversão das poliaminas.....	26
Figura 6 - Sítio de modulação alostérica no receptor NMDA.....	30
Figura 7 - Representação do protocolo comportamental.....	41
Figura 8 - Injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>25-35</sub> em camundongos aumenta a atividade da enzima ODC.....	49
Figura 9 - Bloqueio do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR ou inibição da síntese de poliaminas reverte o déficit de memória induzido por A $\beta$ <sub>25-35</sub> ..	51
Figura 10 - Espermidina reestabelece o déficit cognitivo induzido por A $\beta$ <sub>25-35</sub> em animais tratados com arcaína ou DFMO.....	53
Figura 11 - Modulação do sistema das poliaminas bloqueia o acúmulo nuclear de jacob induzido por A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	55
Figura 12 - Modulação do sistema das poliaminas reduz as alterações no número e morfologia de espinhas dendríticas induzido por A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	58
Figura 13 - Tx3-1 melhora memória de camundongos <i>naïve</i> .....	60
Figura 14 - A administração i.c.v. de Tx3-1 reverte prejuízo de memória induzido por A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	61
Figura 15 - Prejuízo de memória induzido por A $\beta$ <sub>25-35</sub> é revertido pela modulação do sistema das poliaminas: envolvimento de receptores NMDA extrassinápticos.....	65

## LISTA DE ABREVIACOES

**APP** Proteína precursora amiloide

**AZ** Antienzima

**AZIN** Inibidor da antienzima

**A $\beta$**  Peptídeo  $\beta$ -amiloide

**BACE1**  $\beta$ -secretase

**CREB** elemento de ligação responsivo a AMP-c

**DA** Doença de Alzheimer

**LTD** Depressão de longa duração

**LTP** Potenciação de longa duração

**NMDAR** Receptor N-metil-D-aspartato

**NTD** Domínio N-terminal

**ODC** Ornitina descarboxilase

**PS1/PS2** Presinilinas

**PSD** Densidade pós-sináptica

**SNC** Sistema nervoso central

## Sumário

### CAPÍTULO I

<b>I.1. Doença de Alzheimer</b> .....	<b>16</b>
I.1.1 Produção do peptídeo $\beta$ -amiloide: via fisiológica e via patológica .....	18
I.1.2. Doença de Alzheimer: sinaptopatia precede morte neuronal .....	20
<b>I.2. Doença de Alzheimer e receptor NMDA</b> .....	<b>23</b>
I.2.1. Receptor NMDA.....	23
I.2.2. Doença de Alzheimer e o Receptor NMDA.....	24
I.2.3. NMDAR extrassináptico: Ativação fatal .....	25
<b>I.3. Poliaminas</b> .....	<b>27</b>
I.3.1. Biossíntese poliaminas .....	29
I.3.2. Regulação dos níveis celulares de poliaminas .....	31
I.3.3. Poliaminas são moduladores do receptor NMDA .....	32
I.3.4. Poliaminas e Doença de Alzheimer: o perigo endógeno .....	34
<b>I.4. Papel das correntes de <math>K^+</math> do tipo A na Doença de Alzheimer</b> .....	<b>37</b>
<b>I.5. Objetivos</b> .....	<b>40</b>

### CAPÍTULO II

<b>II. Materiais e Métodos</b> .....	<b>43</b>
II.1. Animais .....	43
II. 2. Drogas .....	43
II. 3. Administração de drogas .....	44
<b>II.4. Teste comportamental</b> .....	<b>45</b>
II.4.1. Reconhecimento de Objetos.....	45
<b>II.5. Testes <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i></b> .....	<b>47</b>
II.5.1 Dosagem da atividade da enzima ODC .....	47
II.5.2 Cultura primária de neurônios hipocâmpais.....	48
II.5.3. Ativação de NMDAR extrassináptico e acúmulo nuclear de jacob .....	49
II.5.4. Análise de espinhas dendríticas .....	50
II.5.5. Microscopia confocal de varredura a laser .....	50
<b>II.6. Análise estatística</b> .....	<b>52</b>

### CAPÍTULO III

<b>III. Resultados</b> .....	<b>54</b>
III.1. Modulação do sistema das poliaminas reverte o déficit cognitivo induzido por peptídeo $\beta$ -amiloide <sub>25-35</sub> : envolvimento de receptores NMDA extrassinápticos .....	54

III.2. O bloqueador seletivo de correntes de $K^+$ Tx3-1 isolado do veneno da aranha Phoneutria nigriventer reverte o déficit cognitivo induzido pela injeção de $A\beta_{25-35}$ em camundongos.....	65
---	----

## **CAPÍTULO IV**

<b>IV. Discussão.....</b>	<b>69</b>
IV.1. Modulação do sistema das poliaminas reverte o dano cognitivo induzido por $A\beta_{25-35}$ em camundongos: Envolvimento de receptores NMDA extrassinápticos .....	69
IV.2. O bloqueio de correntes de $K^+$ $I_A$ reverte o déficit cognitivo induzido por $A\beta_{25-35}$ em camundongos .....	74
IV.3. A inserção de canais de $K^+$ que permeiam correntes $I_A$ na membrana de células neuronais é dependente da ativação de receptores NMDA: possíveis efeitos sobre a função cognitiva de animais injetados com $A\beta_{25-35}$ .....	76
<b>IV. 4. Conclusões e Perspectivas.....</b>	<b>78</b>
<b>IV.5. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>80</b>

## **CAPÍTULO V**

<b>V. Produção Relacionada .....</b>	<b>92</b>
V.1. Artigo 1 .....	92
V.2. Artigo 2 .....	120

## **Apresentação**

Esta tese foi realizada no Laboratório de Psicofarmacologia e Neurotoxicidade da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, e no Laboratório de Neuroplasticidade do Instituto Leibniz de Neurobiologia, Magdeburg, Alemanha, sob orientação da professora Maribel Antonello Rubin e apoio do Dr. Michael R. Kreutz. Guilherme Monteiro Gomes recebeu bolsa CAPES-DS e bolsa da Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) para realização deste estudo. Também é relevante destacar a colaboração com o laboratório chefiado pelo Prof. Dr. Marcus Vinícius Gomez, do programa de pós-graduação em farmacologia molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, o que viabilizou os experimentos apresentados no capítulo III tópico 2.

Os métodos e resultados apresentados nos capítulos II e III foram compilados em dois artigos (um deles em revisão), anexados como produção relacionada no Capítulo V desta tese.

A redação na íntegra em português desta tese é uma tentativa de resposta aos investimentos da sociedade, uma vez que este trabalho foi financiado com verbas públicas. Os resultados obtidos estarão disponíveis em um banco de teses acessível a toda a população. Assim, apresentar os resultados em português é um ato de responsabilidade e consciência social.





## I.1. Doença de Alzheimer

*Ao fim, já não era mais.*

Quando o psiquiatra alemão Alois Alzheimer apresentou em um congresso científico os achados de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares em amostras de cérebro da paciente Auguste D., diagnosticada 4 anos antes com demência aos 51 anos de idade, Dr. Alzheimer estava demonstrando as bases do que é hoje o tipo mais comum de demência na população idosa. Contemporâneo de Franz Nissl, que o introduziu a histopatologia cerebral, Alois Alzheimer utilizou técnicas de coloração histológicas criadas por Max Bielschowsky para detectar as alterações neuropatológicas decorrentes da doença que hoje leva seu nome. Numa época em que Freud pregava a psicoanálise, os estudos histopatológicos de Alzheimer ajudaram a propagar a ideia de que doenças psiquiátricas possuíam uma causa biológica, o que faz Alois Alzheimer um dos pais da histopatologia.

Mundialmente, estima-se que 35 milhões de pessoas possuem Doença de Alzheimer (DA), sendo que 58% delas vivem em países em desenvolvimento, número que em 2050 chegará a 71%, atingindo cerca de 80 milhões de pacientes com DA. Esse incremento deve-se em grande parte ao aumento da expectativa de vida da população, visto que a incidência de DA em indivíduos com idade acima de 65 anos é de 5%, enquanto aumenta para 50% em indivíduos acima de 85 anos (Lindsay et al., 2002). Estima-se que o custo anual para o tratamento da DA gire em torno de US\$ 315 bilhões, com um custo de US\$ 4588,00 por paciente/ano nos países em desenvolvimento (Prince & Jackson, 2009). Assim, o número crescente

de indivíduos afetados pela doença e seu alto custo configuram a DA como um problema de saúde pública de ordem global.

A característica mais impactante da DA é o seu poder de despersonalização. A progressão da doença acarreta o declínio das funções cognitivas, onde memórias recentes e remotas são apagadas, subtraindo do indivíduo seu próprio ser. Os primeiros sintomas aparecem em torno dos 60 anos, com falhas na memória de curta duração, repetição de perguntas, e lapsos ao executar tarefas cotidianas, como colocar objetos em seus devidos lugares. Com o passar do tempo o declínio cognitivo se agrava e outras habilidades são afetadas, como pensamento crítico e abstrato, linguagem e fala, alteração na personalidade e memórias remotas. Nesse momento a síndrome atinge não somente o indivíduo, mas também sua família, pois o tempo de cuidado que o doente demanda é cada vez maior. Ao cabo da doença, o indivíduo acometido já não se comunica (afasia), não reconhece objetos comuns (agnosia), e sua condição o mantém isolado das coisas cotidianas. Alguns, ainda, tornam-se agressivos, por não mais reconhecerem seu familiares e cuidadores (Berg & Morris, 1996). A doença tem curso médio de 8 anos, período em que o indivíduo se encontra em estado de incapacitação total, que precede o óbito. Atualmente, não existem terapias efetivas em modificar a progressão da doença de Alzheimer. Os tratamentos disponíveis são somente paliativos e visam aumentar a neurotransmissão colinérgica, através de inibidores da enzima acetilcolinesterase (Mayeux & Sano, 1999), ou bloquear a excitação causada pelo sistema glutamatérgico, com o uso de antagonistas do receptor NMDA, como a memantina (Reisberg et al., 2003).

Do ponto de vista neuropatológico, a DA em seus estágios iniciais pode ser considerada uma sinaptopatia, visto que a perda de contatos sinápticos é o que melhor se correlaciona com o déficit cognitivo presente no início da doença (Davies et al., 1987; DeKosky & Scheff, 1990). Com sua progressão, ocorre neurodegeneração e atrofia de áreas cerebrais cruciais para o processamento de novos aprendizados e armazenamento de memórias, como hipocampo, córtex frontal e entorrinal (Masdeu et al., 2012). Na fase terminal da doença, a atrofia cerebral é generalizada, observando-se um grande alargamento dos sulcos e estreitamento dos giros cerebrais, quando comparado com um cérebro sadio. A neurodegeneração é acompanhada pelo acúmulo de placas senis, formadas por agregados de peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), e a formação de emaranhados neurofibrilares, decorrentes da fosforilação excessiva da proteína *tau* (Grundke-Iqbal et al., 1986; Glenner & Wong, 1984; Masters et al., 1985).

### **I.1.1 Produção do peptídeo $\beta$ -amilóide: via fisiológica e via patológica**

O peptídeo  $A\beta$  é produto da clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Esta proteína transmembrana desempenha funções importantes no sistema nervoso central (SNC), como regulação de plasticidade sináptica e sinaptogênese (Priler 2006), e pode ser processada por diferentes enzimas, em duas vias, uma fisiológica e não-amiloidogênica, outra patológica e amiloidogênica (Figura 1). O processamento fisiológico da proteína APP, através da clivagem sucessiva pelas enzimas  $\alpha$  e  $\gamma$ -secretase, forma um fragmento solúvel ( $sAPP\alpha$ ) e outro fragmento intracelular com 83 aminoácidos (C83) que é degradado pela ação do complexo enzimático  $\gamma$ -secretase, gerando como produto um fragmento com 3 aminoácidos e

outro fragmento intracelular denominado domínio intracelular amiloide (AICD), que são rapidamente degradados (Zhang et al, 2012).

O processamento da proteína APP na via amilodogênica inicia com a ação das enzimas  $\beta$ -secretase (BACE1), que clivam a proteína APP em sua região transmembrana, liberando um fragmento solúvel (sAPP $\beta$ ) e outro intracelular com 99 aminoácidos (C99). O fragmento C99 é posteriormente processado pelo complexo enzimático  $\gamma$ -secretase, composto por 4 componentes: duas isoformas de presenilinas (PS1 e PS2), APH1 e Nicastrin (Vetrivel et al, 2006), que podem degradar esse fragmento em diferentes pontos da sua região transmembrana, formando espécies de A $\beta$  com 38 a 43 aminoácidos, mais ou menos tóxicas de acordo com seu tamanho (Schoonenboom et al., 2005). As formas mais longas de A $\beta$ , de A $\beta$ <sub>1-40</sub> a A $\beta$ <sub>1-43</sub>, são encontradas nas placas amiloides, sendo a forma A $\beta$ <sub>1-42</sub> a mais abundante (Jarrett et al., 1993). Ainda, foi demonstrado que o peptídeo A $\beta$  pode sofrer modificações *in vivo*, sofrendo alterações dependentes do tempo, como rancemização e proteólise, gerando um peptídeo menor (D-Ser<sup>26</sup>-A $\beta$ <sub>25-35/40</sub>) com maior poder tóxico (Kubo et al., 2002).

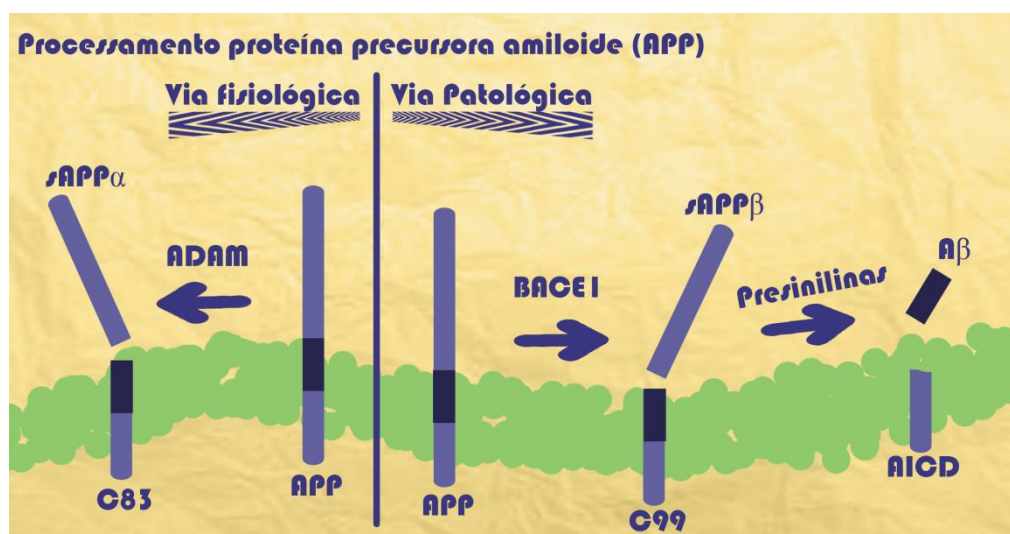


Figura 1: Processamento proteolítico da proteína precursora amiloide (APP) – Via fisiológica e via patológica. ADAM (complexo de  $\alpha$  e  $\gamma$  secretases), BACE1 (complexo de  $\beta$ -secretases).

Tomando o peptídeo A $\beta$  como o principal agente tóxico na DA, diferentes estratégias são utilizadas atualmente na busca dos mecanismos bioquímicos envolvidos no déficit cognitivo induzido por A $\beta$ . Entre os protocolos mais frequentes encontram-se a geração de animais com mutações gênicas tais quais são encontradas em pacientes com DA (LaFerla & Green, 2012), bem como a injeção intracerebroventricular de A $\beta$  (Figueiredo et al., 2013; Zussy et al., 2013). Estes modelos demonstram como o peptídeo A $\beta$  altera mecanismos de plasticidade neuronal, levando ao prejuízo cognitivo (Brouillette et al., 2012). Estas estratégias conferem a pesquisadores algo que não é possível em pacientes com DA, a observação a nível celular do que seria considerado os estágios iniciais da doença, bem como a ação do peptídeo A $\beta$ .

### **I.1.2. Doença de Alzheimer: sinaptopatia precede morte neuronal**

A perda de contatos sinápticos corticais e hipocampais, bem como a falta de correlação entre o déficit cognitivo e a presença de placas senis são características dos estágios iniciais da doença de Alzheimer (Davies et al., 1987; Terry et al., 1991). As alterações sinápticas e cognitivas podem ocorrer muitos anos antes da neurodegeneração (Aisen et al., 2001). Estes achados indicam que alterações na transmissão sináptica, e não a neurodegeneração, seriam responsáveis pelo prejuízo de memória nos estágios iniciais da doença (Selkoe, 2002). Assim, muitos

pesquisadores tem considerado a Doença de Alzheimer uma sinaptopatia em seus estágios iniciais.

Sinapses são estruturas especializadas que permitem a transmissão de sinais eletroquímicos entre neurônios. Sinais fluem através do terminal pré-sináptico, presente nos axônios, até a espinha dendrítica, uma pequena protusão da superfície do dendrito que comporta todo o maquinário do terminal pós-sináptico (Ramón y Cajal, 1894; Hering & Sheng, 2001). A opinião corrente é de que espinhas dendríticas funcionam como um microcompartimento onde as respostas químicas decorrentes da atividade sináptica são separadas do dendrito. Ainda, uma espinha comporta, normalmente, uma única sinapse, o que indica que espinhas seriam compartimentos específicos para transmissão sináptica, e não uma simples expansão da superfície pós-sináptica (Shepherd, 1996; Blackstone & Sheng, 2002). Ademais, estas estruturas são parte essencial de mecanismos de plasticidade sináptica, como metaplasticidade, escalonamento sináptico, plasticidade homeostática, potenciação (LTP) e depressão de longa duração (LTD) (Hering & Sheng, 2001).

Espinhas dendríticas são estruturas dinâmicas, e mudanças em sua morfologia podem acontecer em segundos, minutos ou dias (Fisher et al., 1998; Dunaevsky et al., 1999). Estas alterações fazem parte de mecanismos de plasticidade sináptica, que permitem a formação e remodelação de conexões entre neurônios. As espinhas dendríticas são normalmente classificadas pelo seu formato (figura 2). Peters e Kaiserman-Abramof em 1970 classificaram as espinhas em quatro categorias: filopódias, finas, espessas ou formato de cogumelo. Atualmente sabe-se que existe uma série contínua de formatos entre estas categorias. Ainda, parece existir uma

correlação entre o formato e volume da espinha com a força e maturidade da sinapse. (Arellano et al., 2007).

Diminuição na densidade de espinhas dendríticas e alterações em sua morfologia são encontradas em diferentes distúrbios neuropsiquiátricos, como espectro autista (Schmeisser et al., 2012), esquizofrenia (Hayashi-Takagi et al., 2010) e doença de Alzheimer (Arendt, 2009). Estas alterações estão correlacionadas com a função cognitiva. Enquanto que o alongamento de espinhas está coordenado com a potenciação de longa duração, o encolhimento de espinhas está associado com a depressão de longa duração (Kasai et al., 2010). Na DA, o declínio cognitivo está fortemente relacionado com a redução de sinapses e o número de espinhas dendríticas (DeKosky e Scheff, 199; Walsh e Selkoe, 2004), um efeito que parece ser dependente da ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) (Mota et al., 2013).

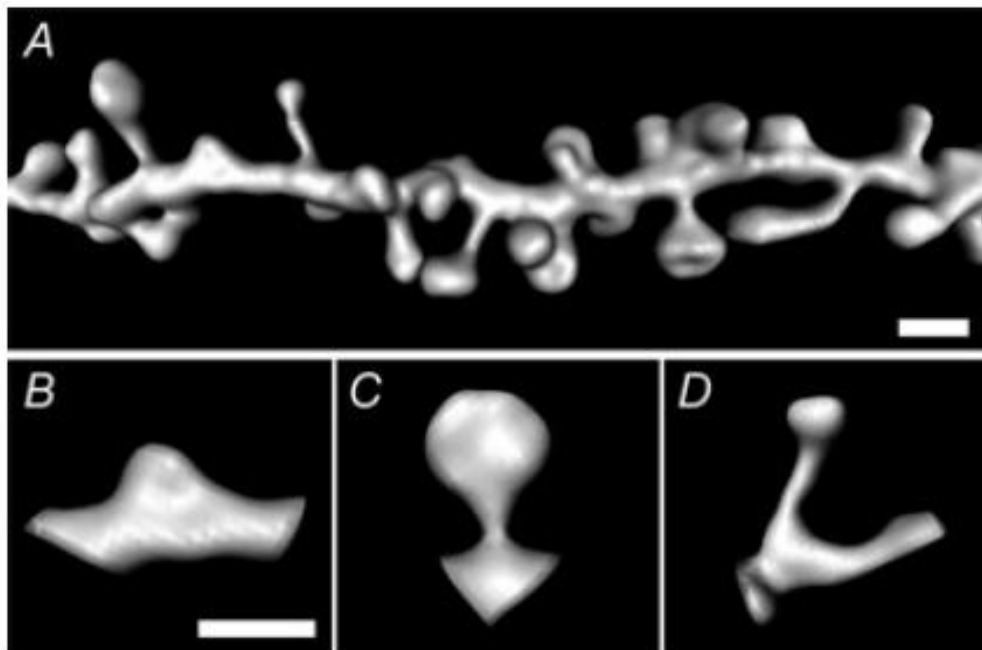


Figura 2: Classificação morfológica de espinhas dendríticas. A) Reconstrução gráfica em 3 dimensões de segmento de dendrito de neurônio piramidal da região CA1 do hipocampo. B) Exemplo de espinha atarracada (<math><0,5 \mu\text{m}</math> de comprimento). C) Exemplo de

espinha cogumelo, com um pescoço curto e cabeça em forma de cogumelo. D) Exemplo de espinha fina, com pescoço alongado e cabeça pequena. Barra de escala representa 1  $\mu\text{m}$ . Adaptado de McKinney (2009).

## **I.2. Doença de Alzheimer e receptor NMDA**

### **I.2.1. Receptor NMDA**

O receptor NMDA é um receptor de membrana ativado por glutamato, pertencente à família de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, responsável por mediar transmissões excitatórias tanto na medula espinhal como no encéfalo. Estudos de clonagem demonstram que esse receptor funciona em heterodímeros com distintas subunidades. Atualmente são conhecidas sete subunidades, divididas em três subfamílias: uma única subunidade GluN1, quatro subunidades GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C e GluN2D), e duas subunidades GluN3 (GluN3A, GluN3B). Estas subunidades podem organizar-se em heterodímeros contendo subunidades GluN1 e GluN2 ou uma mistura de subunidades GluN2 e GluN3 (Paoletti et al., 2013, Sanz-Clemente et al., 2013). O receptor NMDA possui duas características peculiares: é o único ativado por agonista endógeno e dependente de voltagem, e que necessita de dois ligantes endógenos, o glutamato e um coagonista (d-serina ou glicina), para ser ativado (Kleckner & Dingledine, 1988). Em condições de repouso, o poro do receptor NMDA está bloqueado por níveis fisiológicos de  $\text{Mg}^{2+}$ . A ativação do receptor NMDA resulta no influxo de cátions - sódio, potássio e cálcio - através do seu poro. Em neurônios, a ativação deste receptor e o subsequente influxo de cálcio dispara uma cascata de eventos que modifica a eficiência sináptica e a morfologia neuronal, cruciais para plasticidade sináptica (Sanz-Clemente et al., 2013).



O receptor NMDA é conhecido como um detector de coincidências molecular, pois o influxo de íons pelo seu canal ocorre somente quando os neurônios pré e pós-sinápticos são estimulados ao mesmo momento. Neste mecanismo a despolarização da membrana pós-sináptica (que remove o bloqueio do poro realizado por  $Mg^{2+}$ ) coincide com a liberação de glutamato pelo terminal pré-sináptico. A ativação deste receptor está envolvida em mecanismos de aprendizagem e memória, através da modulação de mecanismos de plasticidade sináptica (Sanz-Clemente et al., 2013). Neste contexto, é interessante salientar que enquanto a ativação fisiológica deste receptor é necessária para plasticidade sináptica, a ativação aberrante deste receptor parece estar relacionada com o estabelecimento de processos patológicos (Decker et al., 2010; Mota et al., 2013).

### **I.2.2. Doença de Alzheimer e o Receptor NMDA**

Evidências sugerem que os efeitos patológicos do peptídeo A $\beta$  são mediados por alterações do sistema glutamatérgico (Para uma revisão aprofundada ver Mota et al., 2013), indicando um envolvimento do receptor NMDA no dano induzido pelo peptídeo A $\beta$ . Diversos experimentos demonstram a capacidade desse peptídeo em bloquear mecanismos de plasticidade sináptica dependente de NMDAR, como LTP (Che et al., 2000; Stephan et al., 2001). Memantina, um antagonista do receptor NMDA, além de reverter a inibição da LTP, reverte a perda de espinhas dendríticas causada pelo peptídeo A $\beta$ . A incubação de peptídeo A $\beta_{1-42}$  em cultura de neurônios hipocámpais reduz a expressão da subunidade GluN1 do receptor NMDA e promove endocitose deste mesmo receptor em neurônios corticais (Snyder, 2005), dado similar ao achado em hipocampo de pacientes com DA (Penney et al., 1990).

Lacor e colaboradores (2007) demonstraram que oligômeros de A $\beta$  localizam-se especificamente em sinapses excitatórias que contem receptores NMDA. Ainda, esta espécie de A $\beta$  altera tanto o formato como a densidade de espinhas dendríticas (Shankar et al., 2007). Estes resultados estão em concordância com estudos que mostram que A $\beta$  pode reduzir a expressão de NMDAR na membrana pós-sináptica, através de distintos mecanismos (Snyder et al., 2005; Kurup et al., 2010). Ainda, estudos sugerem que a ativação de NMDAR, especificamente localizados em zonas extrassinápticas, induzida por A $\beta$ , provoca danos sinápticos e aumenta a produção de oligômeros de A $\beta$ , contribuindo assim com a progressão da patologia (Rönicke et al., 2010; Bordji et al., 2010; Bordji et al., 2011; Talantova et al., 2013).

### **I.2.3. NMDAR extrassináptico: Ativação fatal**

O envolvimento do receptor NMDA no prejuízo cognitivo e neurodegeneração à primeira vista pode parecer contraditório, visto que a ativação deste receptor é essencial para plasticidade sináptica e formação do traço mnemônico (Rowland et al., 2005). No entanto, essa dicotomia aparente apresenta possíveis explicações: a intensidade e duração da estimulação do receptor, a interação do receptor com proteínas específicas (Yang, et al., 2011; Yang et al., 2012), as diferentes subunidades que compõem o receptor, e ainda a sua localização subcelular (Hardingham & Bading, 2010), podem ativar mecanismos que levariam ao prejuízo cognitivo. Enquanto o envolvimento dos mecanismos supracitados é plausível, talvez o impacto da ativação de NMDAR em diferentes localizações subcelulares seja o melhor estudado.

A última década trouxe à luz a dramática diferença entre a ativação de receptores NMDA sinápticos e receptores localizados em áreas fora da sinapse, ou seja, extrassinápticos. Enquanto que a ativação de receptores localizados na fenda sináptica leva a expressão de genes relacionados com sobrevivência celular (Papadia et al., 2005), a ativação de receptores NMDA extrassinápticos induz, primariamente, a expressão de genes ligados à morte neuronal, com consequente simplificação da citoarquitetura neuronal e a redução de contatos sinápticos (Hardingham et al., 2002; Dieterich et al., 2008; Hardingham & Bading, 2010; Röncke et al., 2010; Karpova et al., 2013). Neste contexto, jacob, uma proteína que transloca-se da sinapse para o núcleo após a ativação do NMDAR, tem o papel de distinguir no núcleo a natureza do estímulo (sináptico x extrassináptico) (Karpova et al., 2012).

Tanto a ativação de NMDAR extrasinápticos como a aplicação de oligômeros de A $\beta$  em culturas primárias hipocámpais induz a translocação de jacob para o núcleo. O acúmulo nuclear de jacob acarreta na inativação prolongada do fator de transcrição CREB (Dieterich et al., 2008; Röncke et al., 2011). Ainda, enquanto que a superexpressão nuclear de jacob induz a expressão de genes que promovem neurodegeneração, o *knockdown* da proteína tem efeito oposto (Dieterich et al., 2008). Esses dados sugerem jacob como um mensageiro de morte celular na via de ativação de NMDAR extrassináptico (Figura 3) (Dieterich et al., 2008; Kindler et al., 2009; Röncke et al., 2011). Assim, é plausível que substâncias endógenas com ação modulatória sobre NMDAR, como as poliaminas (Mony et al., 2011), possam contribuir com processos patológicos, através da ativação da via de sinalização jacob-extrassináptica.

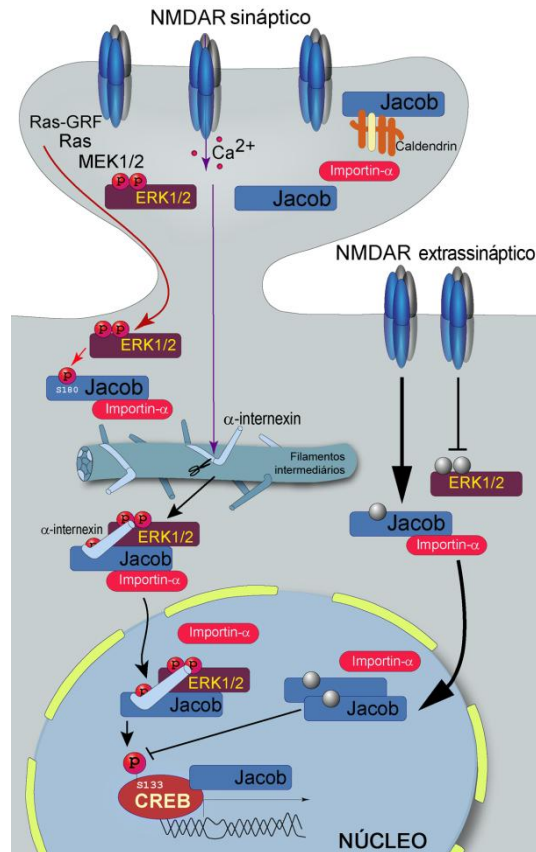


Figura 3: A via de sinalização da proteína Jacob decodifica no núcleo a origem sináptica ou extrassináptica da ativação do NMDAR. A ativação de NMDAR sinápticos leva a ativação de ERK1/2, que se liga a Jacob, que quando fosforilado deixa a sinapse e se dirige ao núcleo. A presença de Jacob fosforilado no núcleo está correlacionado com aumento da fosforilação de CREB e expressão de genes relacionados com plasticidade. A translocação de Jacob após a ativação de NMDAR extrassináptico não requer a ativação de ERK1/2 e Jacob não-fosforilado dirige-se ao núcleo. O acúmulo nuclear de Jacob não-fosforilado resulta na defosforilação de CREB, seguido de eventos deletérios em termos de integridade sináptica que leva a morte celular. Adaptado de Karpova e colaboradores (2012).

### I.3. Poliaminas

Antoni van Leeuwenhoek (1632 – 1723), foi um comerciante, inventor e cientista holandês. É considerado o pai da microbiologia, pois foi o primeiro a descrever organismos unicelulares, utilizando microscópios que ele mesmo construía. Em 1678, descreveu pela primeira vez as poliaminas. Seus nomes triviais,

putrescina, espermidina e espermina provem da fonte de onde foram primariamente isoladas, carne em putrefação e líquido seminal (Coffino, 2001).

As poliaminas são um grupo de amins alifáticas presentes em todas as células eucarióticas, e encontradas em maior abundância em células do cérebro e testículos (Pegg & McCann, 1982). As três poliaminas diferem entre si pelo número de grupamentos amina que cada uma possui: putrescina é uma di-amina primária (1,4 – diaminobutano), espermidina é uma tri-amina (mono-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) e a espermina é uma tetra-amina (bis-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) (Figura 4). Em condições fisiológicas as poliaminas desempenham importante papel em processos biológicos como replicação de DNA, controle da expressão gênica, síntese proteica e modulação de canais iônicos e receptores de membrana. Mas, em condições patológicas, as concentrações de poliaminas podem aumentar drasticamente por diferentes mecanismos, que envolvem a ativação de vias de síntese, bloqueio da degradação ou alterações na liberação e recaptção pela célula. (Bernstein & Müller, 1999; Coffino, 2001; Gugliucci, 2004).

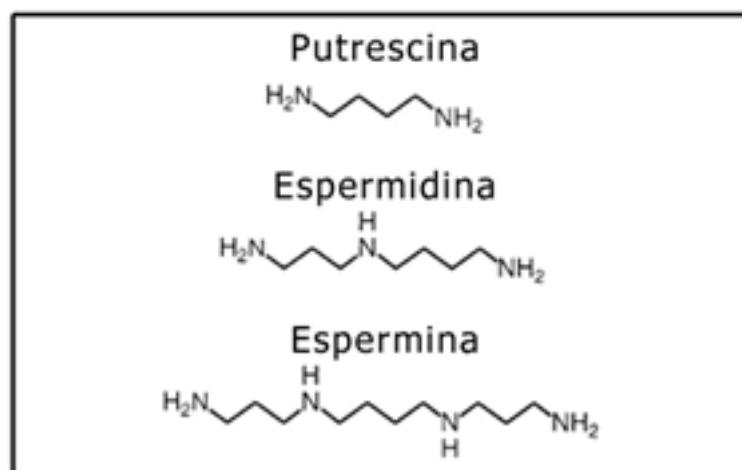


Figura 4: Estrutura química de três poliaminas endógenas.

### I.3.1. Biossíntese poliaminas

Todas as células eucarióticas possuem níveis detectáveis de poliaminas, sendo o cérebro e os testículos as estruturas que apresentam maiores concentrações. As principais fontes de poliaminas a síntese feita pelo próprio organismo ou o metabolismo de aminoácidos provenientes da alimentação, por bactérias do trato gastrointestinal (Teti et al. 2002). Ainda, rotas de interconversão podem levar a síntese *de novo* de espermina, espermidina e putrescina.

O principal substrato para síntese de poliaminas é a ornitina, convertida a putrescina, em uma reação catalizada pela enzima ornitina decarboxilase (ODC), reação passo-limitante na síntese de poliaminas (Figura 5). A ornitina utilizada na síntese de putrescina é originária, na sua maioria, do ciclo de ureia (Morgan, 1999). A síntese de putrescina ainda pode ser atingida pela clivagem da arginina pela enzima arginase (Pegg & McCann, 1982). A putrescina formada pode ser convertida em espermidina, através da adição de um grupamento aminopropil doado pela S-adenosilmetionina descarboxilada, uma reação catalizada pela enzima espermidina sintase. A adição de um novo grupamento aminopropil à espermidina, por sua vez, forma espermina, reação que é catalizada pela enzima espermina sintase (Marton & Pegg, 1995).

Rotas de interconversão permitem que espermina e espermidina sejam recicladas em espermidina e putrescina. Estas reações dependem da formação de intermediários N-acetilados, como N<sup>1</sup>-acetilespermina e N<sup>1</sup>-acetilespermidina, através da ação das enzimas espermidina/espermina N<sup>1</sup>-acetiltransferase. Logo, as ligações C-N entre os resíduos aminopropil e os grupamentos amino secundários

pela enzima poliamina oxidase recupera espermidina e putrescina respectivamente. Estas reações de acetilação fornecem uma maneira para célula diminuir a interação das poliaminas com diferentes poliânions, pela redução das cargas positivas que carregam. O aumento na excreção de poliaminas acetiladas é um dos mecanismos de controle das concentrações intracelulares de poliaminas (Moinard et al., 2005; Morgan, 1999). A figura 5 apresenta um esquema geral com as principais rotas do metabolismo das poliaminas.

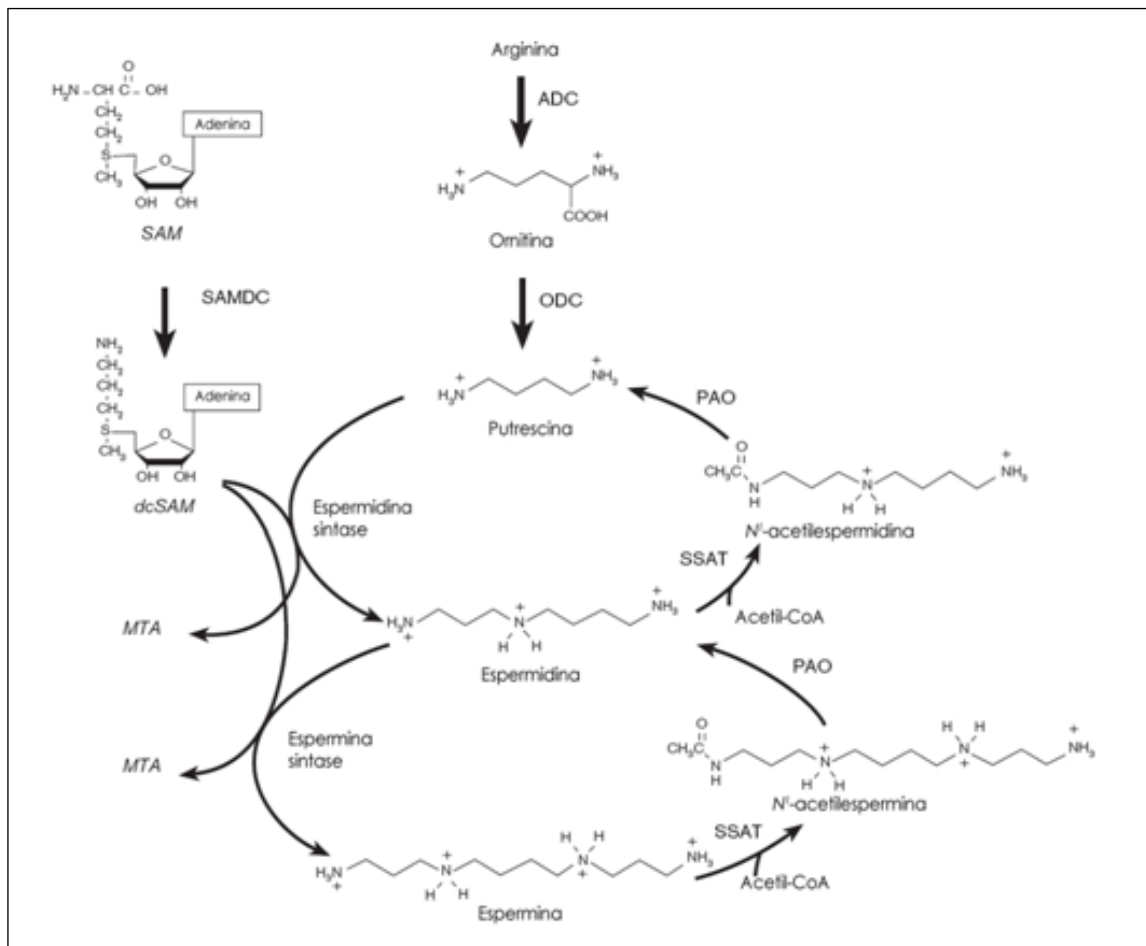


Figura 5: Rotas de metabolismo e interconversão das poliaminas. ADC: Arginina descarboxilase; ODC: Ornitina descarboxilase; SAM: S-adenosilmetionina; SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilase; SSAT: espermidina/espermina acetiltransferase; PAO: Poliamina oxidase; MTA: Metionina. (adaptado de Urdiales et al., 2001).

### I.3.2. Regulação dos níveis celulares de poliaminas

As poliaminas são essenciais para o funcionamento celular e falhas em regular seu níveis podem trazer graves consequências para a célula (Poulin et al, 1993). Assim, mecanismos celulares são necessários para manter níveis ideais de poliaminas.

A reação passo-limitante na síntese de poliaminas é a conversão de ornitina em putrescina, catalisada pela enzima ODC. Esta enzima possui peso molecular de 51 kDa e encontra-se como um homodímero quando ativa. Sua atividade pode ser regulada por um intrincado sistema de proteínas inibitórias, são elas a antienzima (AZ) e os inibidores da antienzima (AZIN). A antienzima possui alta afinidade pela ODC, prevenindo a homodimerização desta enzima através da formação de um conjugado ODC/AZ inativo (Coffino, 2001). Ainda, a formação do conjugado ODC/AZ leva a degradação da ODC pelo proteassoma 26S, em um processo independente de ubiquitinação (Perez-Leal & Merali, 2012). A AZ também pode inibir o transporte de poliaminas através da membrana, utilizando um mecanismo ainda não elucidado (Kahana, 2009).

Enquanto que a ação da AZ é de reduzir o conteúdo celular de poliaminas, os AZIN, por sua vez, atuam promovendo o aumento da atividade da enzima ODC. Apesar de ter sido primeiramente descrito como uma proteína homologa à ODC (Kitani & Fujisawa, 1989), estudos posteriores demonstraram que embora seja homologo, AZIN é desprovido de atividade enzimática. Neste complexo sistema regulatório, o AZIN, que é encontrado em monômeros, possui maior afinidade pela AZ quando comparado com a ODC, e a formação do conjugado AZ/AZIN aumenta a



formação de homodímeros de ODC, aumentando sua atividade e reduzindo sua degradação (Kahana, 2009).

Os níveis intracelulares de poliaminas também pode influenciar a atividade da enzima ODC. Níveis intracelulares elevados de espermidina ou espermina ativam o *frameshifting* translacional<sup>1</sup> do mRNA de AZ, induzindo assim a expressão dessa proteína (Coffino, 2000). Assim, a atividade da ODC é regulada em um sistema de *loop* retroalimentado: aumento dos níveis de poliaminas; poliaminas induzem a produção de antienzima; antienzima inibe e leva a degradação da ODC; síntese de poliaminas é reduzida.

### **I.3.3. Poliaminas são moduladores do receptor NMDA**

As poliamias foram os primeiros moduladores alostéricos descritos do receptor NMDA (Rock & Macdonald, 1995). Uma vez liberadas no espaço extracelular, as poliaminas podem modular a excitabilidade neuronal agindo em diferentes canais iônicos e receptores de membrana, como canais de cálcio e o receptor NMDA (Mony et al., 2009). Experimentos de união específica demonstraram que espermidina e espermina podem aumentar a afinidade do NMDAR por [<sup>3</sup>H]MK-801, estudo clássico que demonstrou o efeito estimulatório das poliaminas sobre o NMDAR (Ramson & Stec, 1988). Ainda, uma curva concentração-resposta bifásica pode ser observada quando diferentes concentrações de espermidina e espermina são testadas sobre a ativação do NMDAR (Rock & Macdonald, 1995).

---

<sup>1</sup>*Frameshifting* translacional é um processo que permite a tradução alternativa de um determinado mRNA. Este processo pode gerar proteínas funcionais a partir da união de distintos mRNAs (Léger et al., 2007).

Espermina (e espermidina) podem produzir três efeitos distintos sobre a ativação do NMDAR (Williams, 1997; Johnson, 1996), a saber:

- 1) Potenciação independente de glicina: Onde espermina potencializa correntes de NMDAR na presença de concentrações saturantes de glicina;
- 2) Potenciação dependente de glicina: espermina aumenta a afinidade do NMDAR por glicina;
- 3) Inibição voltagem-dependente: devido a um rápido bloqueio do poro, semelhante ao realizado por  $Mg^{2+}$ ;

Apesar de décadas de estudo da modulação da atividade do NMDAR pelas poliaminas, a caracterização do sítio de ligação das poliaminas neste receptor é recente (Mony et al., 2011). Através do uso de técnicas moleculares e eletrofisiológicas, foi possível elucidar o sítio de ligação e o mecanismo pelo qual a espermina potencializa a atividade do NMDAR. No modelo proposto por Mony e colaboradores (2011), espermina liga-se na interface formada pelos lóbulos inferiores do domínio N-terminal (NTD) das subunidades GluN1/GluN2B do NMDAR (Figura 6). O dímero formado pelo NTD das subunidades GluN1/GluN2B, que possuem formato de concha, pode alternar entre dois estados conformacionais, um estado ativo e outro estado “tipo-dessensibilizado”. No estado ativado, a região NTD das duas subunidade estão abertas, o que mantém os lóbulos inferiores próximos e aumenta a probabilidade de ligação do agonista. Já no estado dessensibilizado, cargas eletrostáticas mantém os lóbulos inferiores de GluN1 e GluN2B separados, o que provoca o fechamento da região NTD. Espermina e espermidina agem estabilizando o receptor em um estado ativado, aliviando a repulsão eletrostática

que separa os lóbulos inferiores das subunidades GluN1 e GluN2B (Mony et al., 2011).

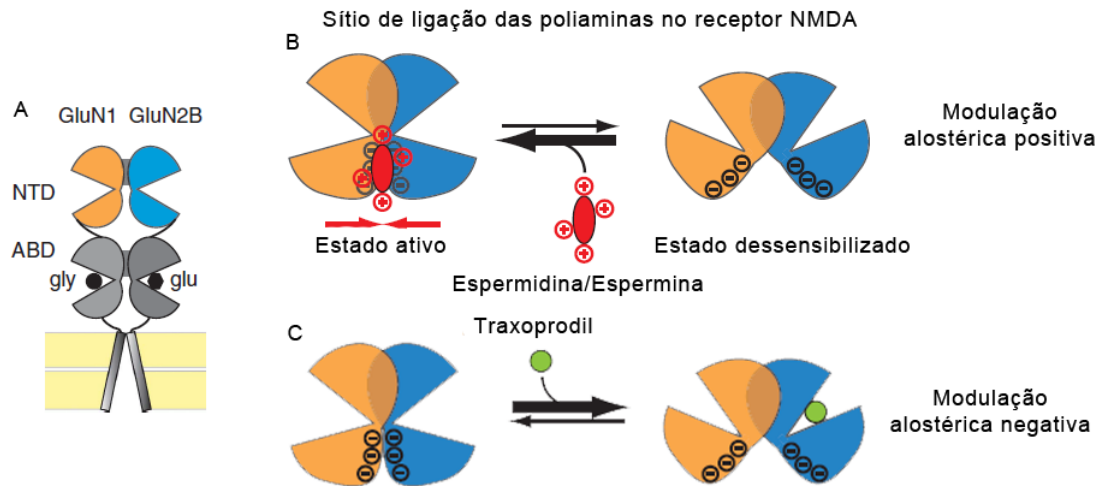


Figura 6: Sítios de modulação alostérica no receptor NMDA. A) Visão esquemática do heterodímero formado pelas subunidades GluN1 e GluN2B. B) Sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA. C) Sítio de ligação de antagonistas da subunidade GluN2B do receptor NMDA. Adaptado de Mony et al., 2011.

A modulação alostérica do receptor NMDA é vista como uma estratégia promissora na busca de novas terapias para distúrbios do sistema nervoso central. Entre as vantagens da modulação de sítios alostéricos do receptor NMDA, e não do sítio de ligação do agonista, citam-se: modulação específica de subunidades do receptor; ligantes alostéricos não competem com o agonista fisiológico; ligantes alostéricos não interferem nos padrões biológicos de atividade do receptor (Mony et al., 2009).

#### I.3.4. Poliaminas e Doença de Alzheimer: o perigo endógeno

Alterações no sistema das poliaminas foram relatadas tanto em pacientes com DA como em experimentos *in vitro* utilizando o peptídeo A $\beta$  como modelo de DA. Estas alterações podem ser encontradas em distintos momentos do sistema,

seja nos níveis de poliaminas (Morrison & Kish, 1995, Inoue et al., 2013), na biosíntese (Morrison et al., 1998) ou na regulação da biosíntese (Mäkitie et al., 2010).

Morrison e Kish (1995) foram os primeiros a relatar níveis elevados de poliaminas no cérebro de pacientes com AD. Análise *post-mortem* de diferentes regiões cerebrais demonstrou um aumento de 70% nos níveis de espermidina no córtex temporal de pacientes com AD em relação ao controle. Já os níveis de putrescina estavam diminuídos em 28% nesta mesma estrutura. O mesmo grupo de pesquisadores já havia relatado um aumento na atividade da enzima SAMDC também no córtex temporal de pacientes com AD. Esta enzima catalisa uma importante reação na síntese de poliaminas, formando S-adenosilmetionina, doador de grupos aminopropil para síntese de espermidina e espermina (Morrison, Bergeron & Kish, 1993). Recentemente Inoue e colaboradores (2013) analisou o perfil metabólico de diferentes áreas do cérebro de pacientes com DA, utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada com espectrometria de massa *time on flight*, relatou níveis aumentados de putrescina, espermidina, espermina, acetil-espermidina e acetil-espermina, tanto no lóbulo temporal como no lóbulo frontal do cérebro com DA. Ainda, os autores argumentam que alterações na atividade da enzima ODC seriam responsáveis pelas alterações relatadas, visto que não foram encontradas diferenças nos níveis de ornitina (Inoue et al., 2013). Assim, alterações nos níveis de poliaminas podem estar coordenadas com mudanças na atividade e expressão de enzimas que participam de sua síntese.

De fato, alterações na atividade e expressão da enzima ODC também foram encontradas em pacientes com DA. Análise *post-mortem* revelou um aumento na atividade da enzima ODC em córtex temporal de pacientes com DA (Morrison et al.,

1998), bem como uma alteração na localização subcelular, sugestivo de um aumento da sua atividade (Nilsson et al., 2006). Ainda, estudos imunohistoquímicos do cérebro de pacientes com DA demonstrou aumento na imunoreatividade de AZIN (Mäkitie et al., 2010). Esta proteína regula a atividade da ODC ligando-se a antienzima, fazendo com que mais ODC esteja livre para formar homodímeros (Coffino, 2001). Mäkitie e colaboradores (2010) também relataram a colocalização de AZIN com receptores NMDA em neurônios piramidais do córtex, sugerindo que AZIN pode regular a transmissão glutamatérgica, através da produção local de poliaminas.

Enquanto que a análise *post-mortem* do cérebro de pacientes com DA demonstrou alterações no sistema das poliaminas, ensaios *in vitro* trouxeram maior conhecimento sobre os efeitos do peptídeo A $\beta$  sobre este sistema. Adição de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (10 $\mu$ M) em cultura de neurônios hipocâmpais aumentou os níveis das três poliaminas, um efeito bloqueado pela adição de DFMO. Ainda, nestas mesmas preparações, a aplicação de A $\beta$ <sub>1-40</sub> induziu morte celular, que foi potencializada pela adição de espermina, mas não alterada pela adição de DFMO (Yatin et al., 2001). Também foi demonstrado que a aplicação de A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou A $\beta$ <sub>25-35</sub> aumenta a atividade da enzima ODC em cultura de neurônios hipocâmpais (Yatin et al., 1999).

Apesar de alterações no sistema das poliaminas terem sido descritas, não existe consenso se essas alterações são parte de um mecanismo de neuroreparação ou atuam potencializando o dano induzido por A $\beta$ . Partidários da primeira opção argumentam que o dano causado pelo peptídeo A $\beta$  deve-se a formação de espécies reativas de oxigênio, e o aumento nos níveis de poliaminas, devido ao seu caráter antioxidante, seria uma resposta celular ao dano (Seidl et al., 1996). Mas, há de se considerar que as poliaminas, por potencializarem a ativação

do receptor NMDA, podem estar envolvidas em mecanismos que levam ao dano neuronal, e que existe uma possível cadeia de causa-efeito onde: A $\beta$  induz ativação da enzima ODC; ocorre o aumento nas concentrações de poliaminas; espermidina e espermina potencializam neurotoxicidade induzida pela ativação do receptor NMDA. É importante salientar que a deposição de placas de A $\beta$ , alteração no metabolismo de poliaminas, aumento na atividade da enzima ODC e neurotoxicidade induzida por NMDAR foram relatados nas mesmas regiões do cérebro de pacientes com AD (Yatin et al., 2001; Mäkitie et al., 2010; Inoue et al., 2013). Ainda, estes dados estão em consonância com estudos que mostram que a plasticidade e transmissão glutamatérgica estão comprometidas logo nos estágios iniciais da doença de Alzheimer (Miguel-Hidalgo et al., 2002).

Assim, neste estudo investigamos o envolvimento do sistema das poliaminas no déficit cognitivo induzido pela injeção i.c.v. de A $\beta_{25-35}$ , um modelo reconhecido de DA. Ainda, utilizando técnicas *in vitro*, investigamos os mecanismos subjacentes ao déficit cognitivo induzido por A $\beta_{25-35}$ , se a modulação do sistema das poliaminas reverte os danos sinápticos induzidos por A $\beta_{25-35}$  em culturas primárias de neurônios hipocampais.

#### **I.4. Papel das correntes de K<sup>+</sup> do tipo A na Doença de Alzheimer**

Canais de potássio (Kv) ativados por voltagem desempenham um importante papel em diversas funções neuronais, como o controle da geração, frequência e padrões temporais de disparos de potenciais de ação (Hille, 2001, Migliore & Sheperd, 2002). Kv são expressos por 4 subfamílias de genes (Kv1, Kv2, Kv3, Kv4)

e podem permear correntes de  $K^+$  de retificação tardia (*delayed rectifier  $K^+$  currents -  $I_K$* ) e correntes de potássio transientes de efluxo (*transient outward  $K^+$  currents -  $I_A$* ), as duas principais correntes de  $K^+$  ativadas por voltagem. Correntes  $I_A$ , codificadas pelos canais Kv1.4, Kv4.2, ou Kv4.3, em neurônios piramidais da região CA1 hipocampal atuam no controle da amplitude de potenciais de ação retropropagadores (Hoffman et al., 1997), bem como definem o limiar para indução de LTP (Chen et al., 2006). Dado a importância destas correntes na indução e manutenção de fenômenos de plasticidade sináptica, modulação destas correntes também pode afetar a formação de memórias.

O envolvimento de correntes  $I_A$  no déficit cognitivo induzido por  $A\beta$  é proposto com base em estudos que mostram que o peptídeo  $A\beta$  possui efeito modulatório sobre estas correntes (Plant et al., 2006, Kerrigan et al., 2008). Ademais, a administração intracerebroventricular de  $A\beta$  em ratos aumenta a expressão de Kv4.2 e Kv4.3, canais que permeiam correntes  $I_A$ .

A mãe natureza é uma fonte rica em toxinas e peptídeos com ações sobre canais iônicos, o que faz cientistas buscarem em venenos de insetos e moluscos peptídeos com alta especificidade e afinidade para um determinado canal. O veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* é uma fonte rica em toxinas que atuam sobre uma variedade de canais iônicos e induzem a liberação de neurotransmissores. A fração 3 purificada do veneno da Phoneutria (PhTx3) é composto com 6 isoformas de toxinas (Tx3 – 1 a 6), cujo principal alvo são canais de cálcio e correntes de potássio ativadas por voltagem (Cordeiro et al., 1993, Gomez et al., 2002). Em particular, a isoforma Tx3-1 inibe correntes  $I_A$  de maneira seletiva, sem afetar outras correntes de  $K^+$  (Kushmerick et al., 1999).

Assim, neste estudo também utilizamos a toxina Tx3-1, inibidora seletiva de correntes  $I_A$ , como ferramenta para o estudo da contribuição destas correntes no prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$ .



## I.5. Objetivos

Diante do exposto, o objetivo deste foi analisar o efeito da modulação do sistema das poliaminas sobre a memória de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$ , um modelo experimental de Doença de Alzheimer, e os mecanismos subjacentes a este efeito. Também avaliamos o envolvimento de correntes de  $K^+$  do tipo A no déficit cognitivo induzido por  $A\beta_{25-25}$ .

### I.5.1. Objetivos Específicos

- Verificar se a administração i.c.v. de  $A\beta_{25-35}$  aumenta a atividade da enzima ODC em hipocampo e córtex de camundongos;
- Verificar se o bloqueio da subunidade GluN2B ou do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR o prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$  em camundongos;
- Verificar se a inibição da atividade da enzima ODC reverte o prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$  em camundongos;
- Verificar se a administração i.c.v. de espermidina bloqueia a melhora de memória induzida por arcaína ou DFMO em camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$ ;
- Verificar se a modulação do sistema das poliaminas bloqueia o acúmulo nuclear de jacob induzido pela aplicação de  $A\beta_{25-35}$  em culturas primárias de neurônios hipocampais;

- Verificar se a modulação do sistema das poliaminas bloqueia os danos sinápticos induzidos pela aplicação de  $A\beta_{25-35}$  em culturas primárias de neurônios hipocâmpais;
- Verificar se o bloqueio seletivo de correntes de  $K^+ I_A$ , reverte o déficit cognitivo de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$ .



## II. Materiais e Métodos

### II.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos adultos (30-40g), provenientes do Biotério Central da UFSM. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes ligadas das 7:00 as 19:00), em temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  com livre acesso a água e comida. Experimentos comportamentais foram realizados em um ambiente com ar e som controlados, onde os animais foram ambientados por 1 hora antes dos experimentos. Todos os experimentos com animais descritos neste estudo foram realizados dentro dos padrões estabelecidos na lei brasileira (Lei Arouca, Nº 11.794/2008), de acordo com as diretrizes ARRIVE para experimentação animal (Kilkenny et al., 2010), as políticas para o uso de animais e humanos em pesquisas de neurociência, revisado e aprovado pela Sociedade de Pesquisa em Neurociência (processo nº: 0206).

### II. 2. Drogas

Traxoprodil (CP – 101,606) (Pfizer, EUA) foi dissolvido em solução salina com 0,3% de Tween 80. Sulfato de 1,4-diguanidinobutano (arcaína; Sigma) foi dissolvida em solução salina (0,9% NaCl). Trihidrocloridrato de N-[3-aminopropil]-1,4-butanediamina (espermidina; Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvida em tampão fosfato (pH 7,4 PBS). Ácido 2,5-diamino-2-(difluorometil) pentanoico (DFMO; Bachem, EUA) foi dissolvido em tampão PBS. Para os experimentos *in vitro*, N-methyl-D-aspartato (NMDA), bicuculina, 4-aminopiridina (4-AP) e MK-801

foram adquiridos da Tocris e dissolvidos em DMSO (concentração final de 0,001%).

Peptídeo  $\beta$ -amiloide<sub>25-35</sub> ou sua sequência invertida,  $\beta$ -amiloide<sub>35-25</sub>, foram dissolvidos em salina em concentrações de 3 mM, e armazenados a - 20°C. O peptídeo A $\beta$  (3 mM) foi agregado de acordo com protocolo realizado por Maurice e colaboradores (1996). A $\beta$ <sub>25-35</sub> e A $\beta$ <sub>35-25</sub> foram incubados a 37°C por 4 dias para induzir a agregação. É interessante salientar que este protocolo forma quase que exclusivamente oligômeros de A $\beta$ , uma espécie de peptídeo mais tóxica (Zussy et al., 2013).

A purificação da toxina Tx3-1 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* seguiu protocolo descrito por Cordeiro e colaboradores (1993). As doses de Tx3-1 testadas foram baseadas em experimentos de eletrofisiologia que avaliaram o efeito da toxina sobre correntes I<sub>A</sub> (Kushmerick et al., 1999).

### II. 3. Administração de drogas

A $\beta$ <sub>25-35</sub>, A $\beta$ <sub>35-25</sub>, espermidina, traxoprodil, arcaína, DFMO e Tx3-1, foram administrados por via intracerebroventricular (i.c.v) de acordo com Dalmolin e colaboradores (2011). Neste método, animais foram anestesiados com isofluorano até que anestesia total foi alcançada. As microinjeções foram realizadas utilizando uma seringa Hamilton de 10 $\mu$ l conectada a uma agulha de 3 mm de comprimento. A agulha foi inserida diretamente no ventrículo lateral, através da pele e crânio, encontrado através da visualização de um triângulo equilátero entre os olhos e o centro do crânio para localizar o bregma, inserindo a agulha 1 mm ao lado deste ponto. Este procedimento evita o uso de força desnecessária, visto que a agulha

penetra na sutura entre as placas craniais. As drogas foram injetadas em um volume de 3 µl durante 5 segundos, logo após, a agulha foi deixada no local por 10 segundos adicionais para prevenir refluxo e permitir a difusão das drogas. Quando co-administração foi realizada, drogas foram injetadas com a ajuda de um tubo de polietileno conectado a seringa. Uma bolha de 1 cm manteve as drogas separadas e um intervalo de 30 segundos separou a administração de cada droga.

## **II.4. Teste comportamental**

### **II.4.1. Reconhecimento de Objetos**

A tarefa do reconhecimento de objetos envolve o reconhecimento de um objeto familiar juntamente com a detecção de um novo objeto. Este teste depende somente do comportamento exploratório inato do roedor, sem a necessidade de se aplicar estímulos nocivos, o que é considerado uma vantagem sobre outras tarefas (Antunes & Biala, 2012). Ainda, o reconhecimento de objetos é uma tarefa particularmente interessante para o estudo das bases neurobiológicas em modelos de DA, visto que a memória de reconhecimento é uma das primeiras a serem afetadas nessa doença (Dickerson & Eichenbaum, 2010).

A tarefa de reconhecimento de objetos foi realizada em uma caixa de madeira (30 x 30 x 30 cm), com as paredes pintadas de preto, e a frente de acrílico transparente, com o assoalho coberto com uma folha de etil vinil acetato. Uma lâmpada 60 cm distante da caixa manteve a iluminação em 40 lux, e um ar-condicionado forneceu isolamento sonoro constante. Blocos plásticos de montar, com diferentes formas e cores, mas mesmo tamanho, foram utilizados como objetos. Durante todo experimento, os objetos foram utilizados de maneira balanceada e os

animais não demonstraram preferência por nenhum dos objetos. Tanto os objetos como o aparato comportamental foram limpos com uma solução 30% etanol antes e depois de cada teste.

Seis dias após a administração de peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> ou A $\beta$ <sub>35-25</sub>, a tarefa de reconhecimento de objetos foi realizada de acordo com Wang e colaboradores (2007), com algumas modificações. A tarefa possui 3 sessões: habituação, treino e teste, cada uma delas com duração de 8 minutos. Na primeira sessão o animal foi habituado ao aparato comportamental, sem a presença de objetos. Na segunda sessão, realizada 24h após a habituação, os animais foram expostos a dois objetos iguais (objeto A), e o tempo de exploração de ambos os objetos foi cronometrado com dois cronômetros. Na sessão de teste, realizada 24h após o treino, foi colocado um novo objeto na caixa (Objeto B) e o tempo que o animal explorou cada um dos objetos foi cronometrado. Considerou-se exploração quando o animal cheirou ou tocou com o nariz os objetos. O ato de subir, sentar ou morder os objetos não foi considerado exploração. A partir dos tempos de exploração da sessão de teste, o índice de discriminação foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$ID = \left[ \left( \frac{T_{novo} - T_{familiar}}{T_{novo} + T_{familiar}} \right) \right] \times 100$$

Imediatamente após a sessão de treino, os animais receberam os seguintes tratamentos: veículo, traxoprodil (0,002 – 0,02 nmol/sítio), arcaína (0,02 – 0,2 nmol/sítio) ou espermidina (2 nmol/sítio). DFMO (0,27 – 27 nmol/sítio) foi administrado 1 hora antes do treino. As doses utilizadas foram baseadas em estudos pilotos e curvas dose-efeito. Uma linha do tempo com os tratamentos e tempos de administração pode ser vista na figura 7. Tx3-1 (10 – 100 pmol/sítio) também foi

administrada imediatamente após o treino, e os resultados podem ser encontrados na sessão II do capítulo III.

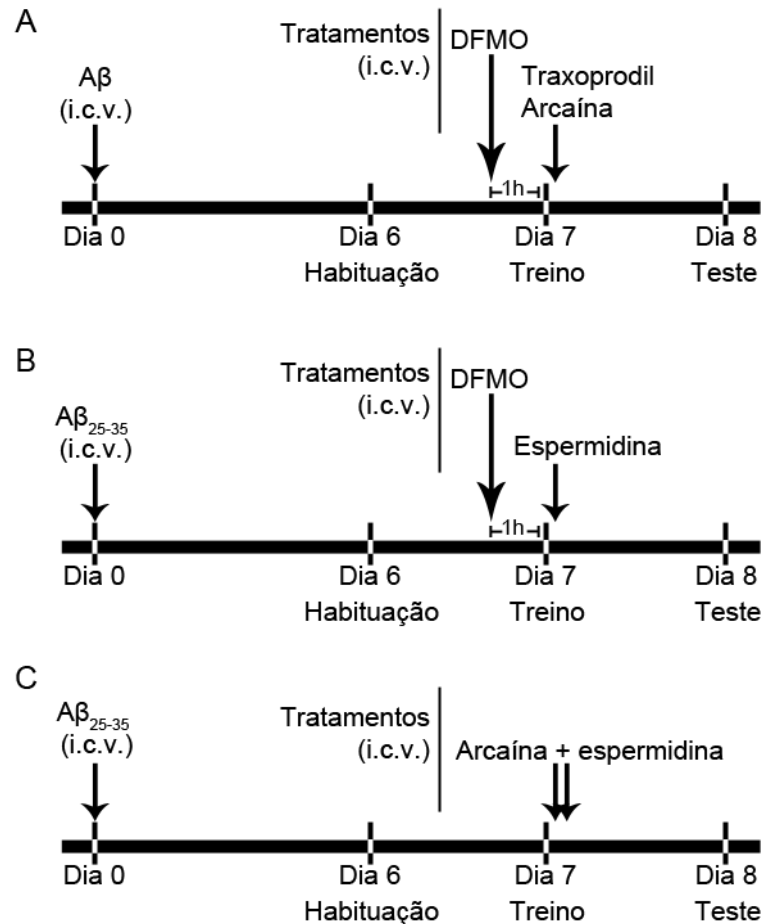


Figura 7: Representação do protocolo comportamental. A) Protocolo utilizado para os experimentos apresentados na figura 8. B) e C) Protocolo utilizado para os experimentos apresentados na figura 9.

## II.5. Testes *ex vivo* e *in vitro*

### II.5.1 Dosagem da atividade da enzima ODC

Atividade da enzima ODC foi realizada em hipocampo e córtex de camundongos injetados com  $A\beta_{35-25}$  ou  $A\beta_{25-35}$ . Sete dias após a injeção i.c.v. do peptídeo  $A\beta$ , os animais foram treinados na tarefa do reconhecimento de objetos, e 1 hora após o treino foram eutanasiados e as estruturas cerebrais foram dissecadas



para dosagem da atividade da enzima ODC de acordo com Silva e colaboradores (2011). As amostras foram homogeneizadas em tampão (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) contendo 2,5 mM de DL-ditiotreitol (DTT) e 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Após 10 minutos de incubação a 4°C, os homogenatos foram centrifugados a 35,000 x g por 45 min a 4°C, e o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteína da amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para determinar a atividade da enzima ODC, 200 µl (0,5 mg/ml de proteína) do sobrenadante foi adicionado ao tampão de ensaio (1M Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM de DTT, 2 mM de fosfato piridoxal, 20 mM de l-ornitina e 0,1 mM de Ci/MI l-[1-<sup>14</sup>C]-ornitina), em tubos selados. Uma fita de papel filtro umidificada com 1 M de hidróxido de amônia foi colocada dentro do topo de cada tubo e a mistura foi incubada por 30 min a 37°C. Ácido sulfúrico (250 µl, 5 M) foi adicionado em cada tubo, e a mistura foi incubada por mais 30 min a 37°C. Ao fim da incubação, os papéis-filtro foram coletados para medição de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> liberados a partir de [1-<sup>14</sup>C]-ornitina por meio de cintilografia. A atividade da ODC foi expressa como percentagem em relação ao grupo controle.

### **II.5.2 Cultura primária de neurônios hipocâmpais**

Cultura primária de neurônios hipocâmpais foram preparadas de acordo com Dieterich e colaboradores (2008) utilizando embriões de ratos Wistar com 19 dias, provenientes da criação do Instituto Leibniz de Neurobiologia, Magdeburg, Alemanha. As células foram cultivadas em uma densidade de 40000 células por lâmina, em 1 ml de meio neurobasal (NB)(Gibco) suplementado com B27 (Life

Technologies) e 200 mM L-glutamina. As culturas foram mantidas em estufa umidificada (95% ar, 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C.

### II.5.3. Ativação de NMDAR extrasináptico e acúmulo nuclear de jacob

Com o intuito de avaliar a ativação de receptores NMDA extrassináptico e o subsequente acúmulo de proteína jacob no núcleo, ensaio *in vitro* foi realizado de acordo com Behnisch e colaboradores (2011). Este protocolo é efetivo em induzir o acúmulo nuclear de jacob não-fosforilado, com a redução concomitante dos níveis de jacob em espinhas e dendritos (Karpova et al., 2013). Neurônios hipocámpais (21 dias *in vitro*) foram incubados sucessivamente com 50 µM bicuculina, 2,5 mM 4-AP e 10µM de MK-801, para obter o bloqueio irreversível de receptores NMDA sinápticos ativados. Após 30 minutos de incubação, as culturas neuronais foram lavadas com meio neurobasal e as seguintes drogas foram aplicadas: 200µM NMDA (lavado após 3 minutos) ou espermidina (400µM). Aβ<sub>25-35</sub> (10µM), traxoprodil (4nM), arcaína (4µM), DFMO (5µM), ou ainda a combinação de Aβ<sub>25-35</sub> + traxoprodil, Aβ<sub>25-35</sub> + arcaína, Aβ<sub>25-35</sub> + DFMO, foram aplicados por 30 minutos antes da fixação das células. Em todos os experimentos foi utilizado meio de cultura contendo anisomicina (7,5 µM) com o intuito de bloquear a síntese de novas proteínas.

Após incubação com as drogas, culturas foram processadas para imunocitoquímica. Anticorpos primários foram diluídos em tampão de bloqueio (coelho anti-pan-jacob 1:350, camundongo anti-MAP-2 1:500 (Sigma)), e incubados *overnight* a 4°C. Após lavagem com PBS, culturas foram incubadas com anticorpo secundário (rato anti-coelho alexa 488 1:500, burro anti-camundongo alexa 568

1:500) DAPI (1:1000, 10 min) e montadas em slides com meio de montagem (Mowiol®).

#### II.5.4. Análise de espinhas dendríticas

Com o intuito de analisar o número e a morfologia de espinhas dendríticas, culturas primárias de neurônios hipocâmpais foram transfectadas com plasmídeo eGFP entre os dias 7/9 *in vitro*, utilizando Lipoafectamine 2000 (Life Technologies), segundo método de Kapitein e colaboradores (2011). Neste protocolo, 1.8 µg de plasmídeo eGFP-N1 (Clontech, Mountain View) foi incubado com 3 µl de Lipofectamine 2000 em 200 µl de meio NB por 30 min. Esta mistura foi aplicada as culturas neuronais seguindo um período de incubação de 60 min (37°C em 5% CO<sub>2</sub>). Logo após, o meio contendo o mix de transfecção foi trocado por meio NB condicionado e as culturas foram mantidas por 2 semanas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>, até a realização do experimento.

No dia 21 *in vitro*, as culturas neuronais foram incubadas com Aβ<sub>25-35</sub> (10µM) por 24h. Duas horas antes da fixação (4% paraformaldeído), foram aplicados traxoprodil (4nM), arcaína (4µM) ou DFMO (5µM). Culturas neuronais expressando GFP foram lavadas, permeabilizadas com Triton X-100 (0,2%) em PBS por 10 minutos, lavadas com PBS e montadas em slides com meio de montagem (Mowiol®). As concentrações das drogas e duração dos tratamentos foram baseados em trabalhos anteriores (Yatin et al., 1997; Yatin et al., 2001).

#### II.5.5. Microscopia confocal de varredura a laser

Imagens foram obtidas utilizando microscópio confocal (Leica TCS-SP5-II. Leica-Microsystems, Mannheim, Alemanha) equipado com objetiva Plan Apo 63x óleo 1.4 NA e lasers diodo (405), argon (458, 476, 488, 495, 514 nm), *Diode Pumped Solid State* (DPSS, 561 nm) e HeNe (633 nm). As configurações de intensidade de laser e detecção de sinal foram mantidas constantes durante os experimentos a fim de permitir a comparação quantitativa entre os grupos experimentais. Neurônios foram escaneados em secções ópticas seriadas com 0.29 µm de intervalo. Imagens foram processadas utilizando o software ImageJ (ImageJ software, NIH, Bethesda, EUA), e de acordo com cada experimento, a máxima intensidade ou a intensidade média de projeção foi obtida a partir do *z-stack* de núcleos celulares individuais e ramificações dendríticas.

Para os experimentos analisando a densidade e morfologia de espinhas dendríticas, foram utilizados de um a três segmentos de dendrito (20 µm) de cada neurônio, distal ou proximal ao soma. Análise foi realizada utilizando o software NeuronStudio 0.9.92 (Rodriguez et al., 2008; Computation Neurobiology and Imaging Center, Mount Sinai School of Medicine, Nova Iorque, EUA). Espinhas foram definidas como protusões distintas do segmento dendrítico, restritas somente aquelas visíveis nos planos x e y.

Quantificação do acúmulo nuclear de jacob foi realizado de acordo com Dieterich e colaboradores (2008). Imagens foram abertas com softwares Image J e a região de interesse (ROI) nuclear foi definida utilizando o limiar da coloração fluorescente DAPI. A imunoreatividade nuclear foi medida como valores médios de cinza (unidades arbitrárias em intensidade de pixel) e apresentados nos gráficos normalizados em relação ao grupo controle.

## II.6. Análise estatística

Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 5.01, e Microsoft Office Excel 2007. Valores nos gráficos estão demonstrados como média  $\pm$  erro padrão médio. Análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias foi realizada de acordo com cada experimento, seguido de teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls (SNK). Valores de  $P < 0.05$  foram considerados significantes.



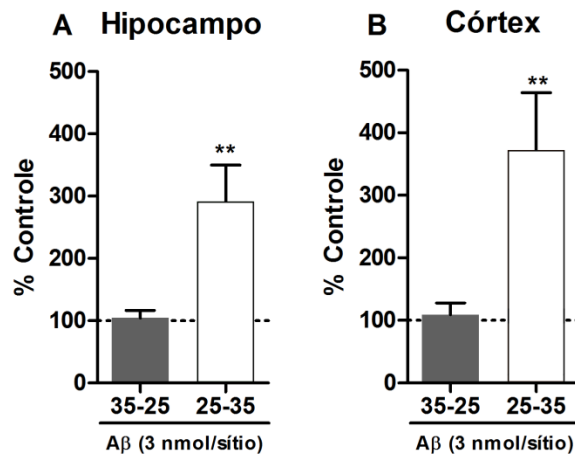
### III. Resultados

#### III.1. Modulação do sistema das poliaminas reverte o déficit cognitivo induzido por peptídeo $\beta$ -amilóide<sub>25-35</sub>: envolvimento de receptores NMDA extrassinápticos

Os resultados apresentados nesta sessão fazem parte do artigo científico presente no Capítulo V desta tese. Este trabalho foi realizado em colaboração com o laboratório de Neuroplasticidade, coordenado pelo Dr. Michael R. Kreutz e localizado no Instituto Leibniz de Neurobiologia, Magdeburg, Alemanha. Esta colaboração foi viabilizada através de bolsa de doutorado-sanduiche concedida pela agência de intercâmbio acadêmico do governo alemão DAAD. O autor agradece o auxílio e empenho de Michael Kreutz, Anna Karpova e Julia Bär na realização deste trabalho.

##### III.1.1. A injeção i.c.v. de $A\beta_{25-35}$ aumenta a atividade da enzima ODC em córtex e hipocampo de camundongos

Com o intuito de verificar se a administração i.c.v. de  $A\beta_{25-35}$  altera a atividade da enzima ODC, foi realizada análise *ex vivo* da atividade enzimática em hipocampo e córtex de camundongos injetados com  $A\beta_{35-25}$  ou  $A\beta_{25-35}$ . Análise estatística demonstrou que a administração de  $A\beta_{25-35}$  aumenta a atividade da enzima ODC nas duas estruturas analisadas. No hipocampo (Fig. 8A) a atividade foi aproximadamente 3 vezes maior no grupo injetado com  $A\beta_{25-35}$  ( $t_{13}= 2.282$ ,  $p=0,001$ ), enquanto que no córtex (Fig. 8B) o aumento foi de aproximadamente 3,7 vezes ( $t_{13}=3.331$ ,  $p=0,0009$ ), quando comparado ao grupo controle.



**Figura 8:** A administração de  $A\beta_{25-35}$  aumenta a atividade da enzima ODC em hipocampo (A) e córtex (B) de camundongos. Dosagem foi realizada 7 dias após a injeção i.c.v. de  $A\beta_{25-35}$ , 1 hora após o treino do reconhecimento de objetos. Dados apresentados como média + erro padrão. N=7 - 8 amostras por grupo para (A). N=6 - 9 amostras por grupo para (B). \*\* $P < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

### III.1.2. Bloqueio do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR ou inibição da síntese de poliaminas reverte o prejuízo de memória induzido por $A\beta_{25-35}$

Neste estudo avaliamos se a modulação do sistema das poliaminas pode bloquear o prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$ . Animais injetados com  $A\beta_{25-35}$ , ou peptídeo controle  $A\beta_{35-25}$ , foram tratados com traxoprodil, antagonista da subunidade GluN2B do NMDAR, arcaína, antagonista do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR, ou DFMO, inibidor da síntese de poliaminas, imediatamente após o treino da tarefa de reconhecimento de objetos. O tempo de exploração de cada um dos objetos na sessão de treino foi similar para todos os grupos, demonstrando que os animais não possuíam preferência prévia por qualquer um dos objetos. Entretanto, na sessão de teste, animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  tiveram um



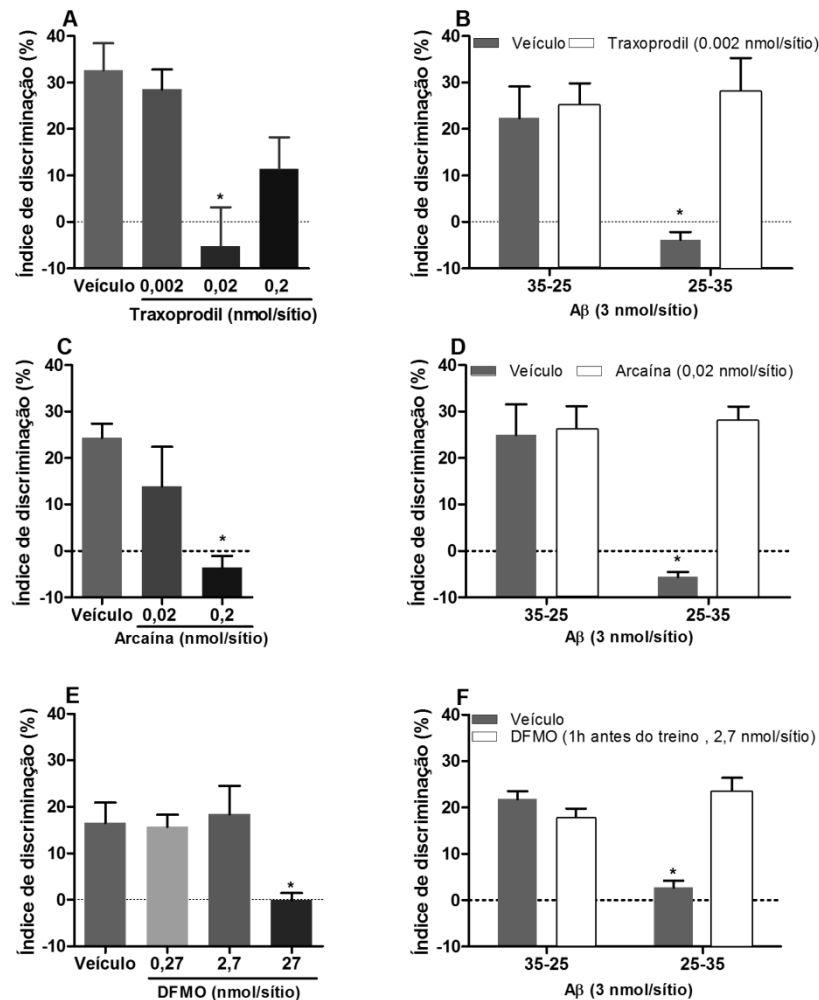
índice de discriminação significativamente menor que o grupo controle, indicando assim o déficit de memória induzido por este peptídeo ( $P < 0,05$ , Fig 9B, D, F)

A administração de traxoprodil (0,02 nmol/sítio) reduziu significativamente o índice de discriminação de animais na tarefa de reconhecimento de objetos (ANOVA de uma via,  $F_{(3,15)}=6,736$ ,  $P < 0,01$  Fig. 9A). Por outro lado, o tratamento com traxoprodil, em uma dose sem efeito *per se* em animais controle (0,002 nmol/sítio), recuperou a memória de animais injetados com  $A\beta_{25-35}$ , evidenciado por um aumento no índice de discriminação quando comparado com animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  e tratados com veículo (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,16)}=6,303$ ,  $P < 0,05$ , Fig. 9B).

A administração de arcaína (0,2 nmol/sítio) reduziu o índice de discriminação de animais na tarefa de reconhecimento de objetos (ANOVA de uma via,  $F_{(2,6)}=6,705$ ,  $P < 0,05$  Fig. 9C). Já em animais injetados com peptídeo  $A\beta_{25-35}$ , arcaína, em uma dose sem efeito *per se*, melhorou o desempenho destes animais na tarefa de reconhecimento de objetos. Animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  e tratados com arcaína tiveram um maior índice de discriminação quando comparado com animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  e tratados com veículo (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,16)}=181,91$ ,  $P < 0,001$ , Fig. 9D), sugerindo que o possível envolvimento do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR no prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$ .

A fim de testar se o bloqueio da síntese de poliaminas poderia reverter o déficit cognitivo induzido por  $A\beta_{25-35}$ , animais foram tratados com DFMO, inibidor irreversível da enzima ODC, uma hora antes do treino da tarefa do reconhecimento de objetos. A administração de DFMO (2,7 nmol/sítio) reduziu significativamente o índice de discriminação quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via,  $F_{(3,8)}=4,44$ ,  $P < 0,05$  Fig. 9E). Por outro lado, DFMO, quando administrado em uma dose sem efeito *per se*, reverteu o prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$ .

Análise estatística (ANOVA de duas vias) demonstrou um aumento significativo no índice de discriminação de animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  e tratados com DFMO quando comparado com animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  e tratados com veículo ( $F_{(1,25)}=24,44$ ,  $P<0,001$ , Fig 9F).

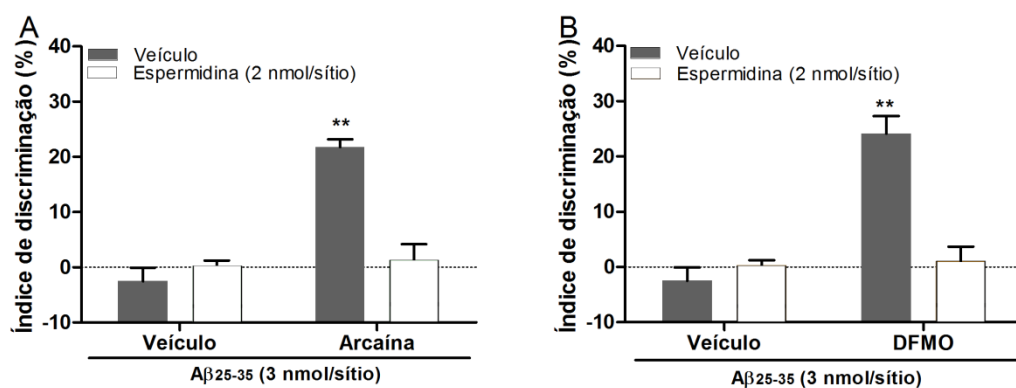


**Figura 9:** Traxoprodil (A, B), arcaína (C, D) e DFMO (E, F) revertem o prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$  em camundongos na tarefa do reconhecimento de objetos. i.c.v. – intracerebroventricular. Traxoprodil e arcaína foram administrados imediatamente após o treino. DFMO foi administrado 1 hora antes do treino. Dados demonstrados como média + erro padrão. N=3 – 5 animais por grupo para A, C, E. N=5 – 9 animais por grupo para B, D, F. \* $P<0,05$  quando comparado ao grupo controle.

Visto que tanto arcaína como DFMO revertem o déficit cognitivo de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$ , o próximo experimento verificou se a

administração de espermidina, e assim o reestabelecimento de um tônus poliaminérgico, bloquearia o efeito benéfico de arcaína e DFMO sobre a memória de animais injetados com  $A\beta_{25-35}$ .

Enquanto que camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$  e tratados com arcaína (0,02 nmol/sítio) demonstraram elevados índices de discriminação, a coadministração de espermidina (2 nmol/sítio), significativamente reduziu o índice de discriminação destes animais (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,22)}=72,09$ ,  $P<0,0001$ , Fig. 10A). Em um segundo experimento, camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$  receberam administração de DFMO (2,7 nmol/sítio) uma hora antes do treino e espermidina (2 nmol/sítio) imediatamente após. Este protocolo de administrações reverteu significativamente o efeito do DFMO sobre a memória de animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,23)}=69,39$ ,  $P<0,0001$ , Fig.10B). Os dados apresentados sugerem que, em animais injetados com  $A\beta_{25-35}$ , alterações nas concentrações de poliaminas podem influenciar a aquisição de novas memórias.



**Figura 10:** Administração de espermidina reestabelece o prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$  em camundongos tratados com arcaína ou DFMO. (A)

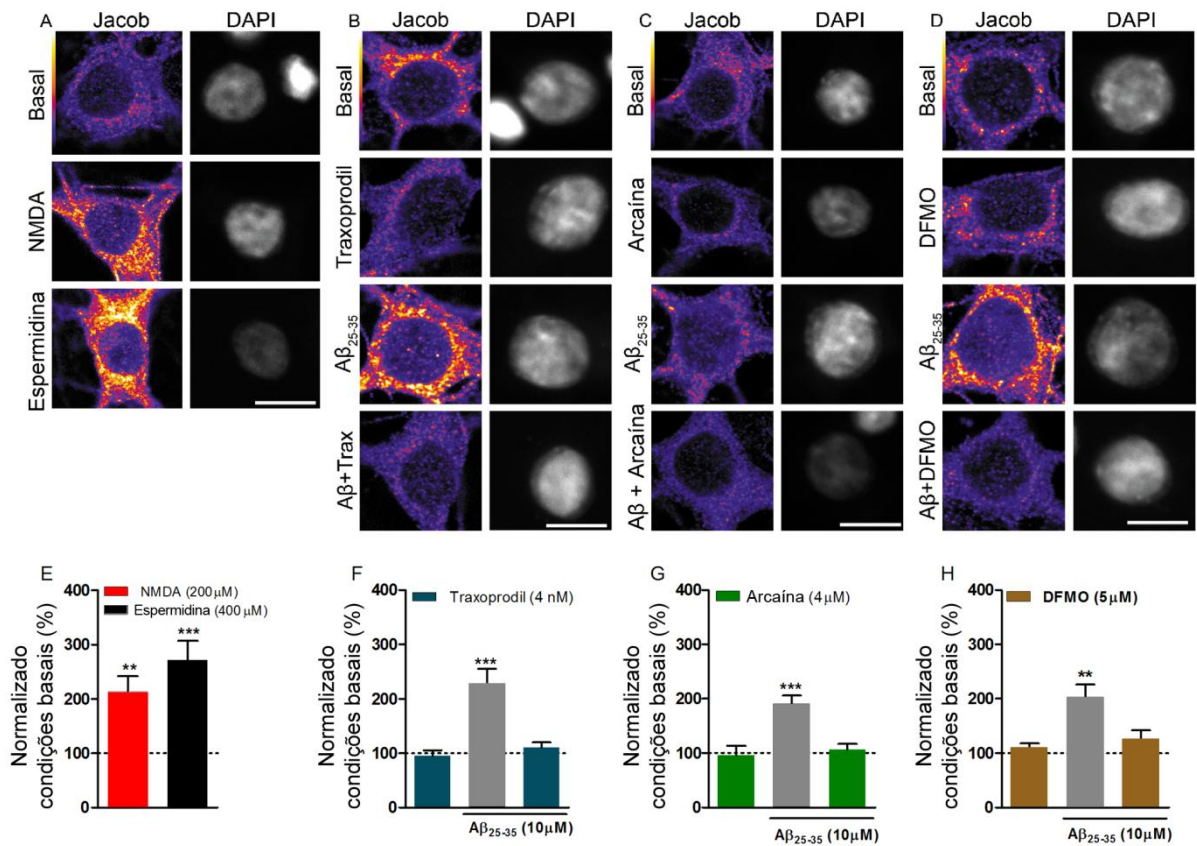
Espermidina (2 nmol/sítio) foi coadministrada com arcaína (0,02 nmol/sítio) imediatamente após o treino. (B) DFMO (2,7 nmol/sítio) foi administrado 1 hora antes do treino e espermidina foi administrada imediatamente após o treino. I.c.v. – intracerebroventricular. Dados demonstrados como média + erro padrão. N=6-7 por grupo. \*\*\* $P < 0.0001$  quando comparado ao grupo controle.

### **III.1.3. Modulação do sistema das poliaminas bloqueia o acúmulo nuclear de jacob induzido por $A\beta_{25-35}$**

A ativação de receptores NMDA extrassinápticos é responsável pela translocação da proteína jacob para o núcleo, um evento que é seguido pela desfosforilação de CREB, redução de contatos sinápticos e simplificação da citoarquitetura neuronal, que eventualmente levam a morte celular (Dieterich et al., 2008). Estudos prévios demonstraram que a aplicação de  $A\beta_{1-42}$  em culturas primárias de neurônio ou fatias de hipocampo induz o acúmulo de jacob no núcleo, um fenômeno coordenado com a ativação de receptores NMDA extrassinápticos (Rönicke et al., 2010). Assim, é plausível que a via de sinalização da proteína jacob possa estar envolvida no déficit cognitivo induzido por  $A\beta_{25-35}$ . Com o intuito de testar se a modulação do sistema das poliaminas poderia bloquear o acúmulo de proteína jacob no núcleo induzido por  $A\beta_{25-35}$ , culturas primárias de neurônios hipocampais foram estimuladas de acordo com protocolo descrito em Behnisch e colaboradores (2008). O acúmulo nuclear da proteína jacob foi determinado por método de imunocitoquímica.

A aplicação de NMDA (200  $\mu\text{M}$ ) por 3 minutos induziu o aumento nos níveis de jacob no núcleo (Fig 11A, 11E). Da mesma maneira, a aplicação de espermidina (400  $\mu\text{M}$ , 30 min) induziu o acúmulo nuclear de jacob (ANOVA de uma via,  $F_{(2,40)}=16,05$ ;  $p < 0,0001$ , Fig. 11A, 11E). Além disso, aplicação de  $A\beta_{25-35}$  (10  $\mu\text{M}$ , 30

min) também induziu o aumento dos níveis nucleares de jacob (Fig 11B, 11C, 11D, 11F, 11G, 11H). A coaplicação de  $A\beta_{25-35}$  e traxoprodil (4 nM) (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,83)}=13,52$ ,  $p=0,0004$ , Fig. 11B, 11F) ou arcaína (4  $\mu$ M) (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,65)}=10,24$ ,  $p=0,002$ , Fig. 11C, 11G) bloqueou o acúmulo nuclear de jacob induzido pelo peptídeo  $A\beta_{25-35}$ . Além disso, a incubação de neurônios com DFMO (5  $\mu$ M) 10 minutos antes da aplicação de  $A\beta$ , significativamente reduziu a translocação de jacob para o núcleo (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,75)}=8,262$ ,  $p=0,0052$ , Fig. 11D, 11H). Estes resultados sugerem que o sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, localizado fora da sinapse, pode estar envolvido na cascata de eventos que leva ao acúmulo nuclear de jacob induzido por  $A\beta_{25-35}$ .



**Figura 11:** Espermidina ou Aβ<sub>25-35</sub> induzem o acúmulo nuclear de jacob em cultura de neurônios hipocâmpais através da estimulação de NMDAR extrassináptico. (A, E) NMDA (200 μM) e espermidina (400 μM) aumentam o acúmulo nuclear de jacob. (B, F) Acúmulo nuclear de jacob induzido por Aβ<sub>25-35</sub> é bloqueado pela coincubação com traxoprodil (4 nM) ou arcaína (C, G). Incubação com DFMO (5 μM) 10 minutos antes da aplicação de Aβ<sub>25-35</sub> também bloqueou a translocação de jacob para o núcleo (D, H). Barra de escala representa 10 μm. Dados apresentados como média + erro padrão. N:17-24 células por grupo. \*\**P*<0,001 e \*\*\**P*<0,0001 quando comparado ao grupo controle.

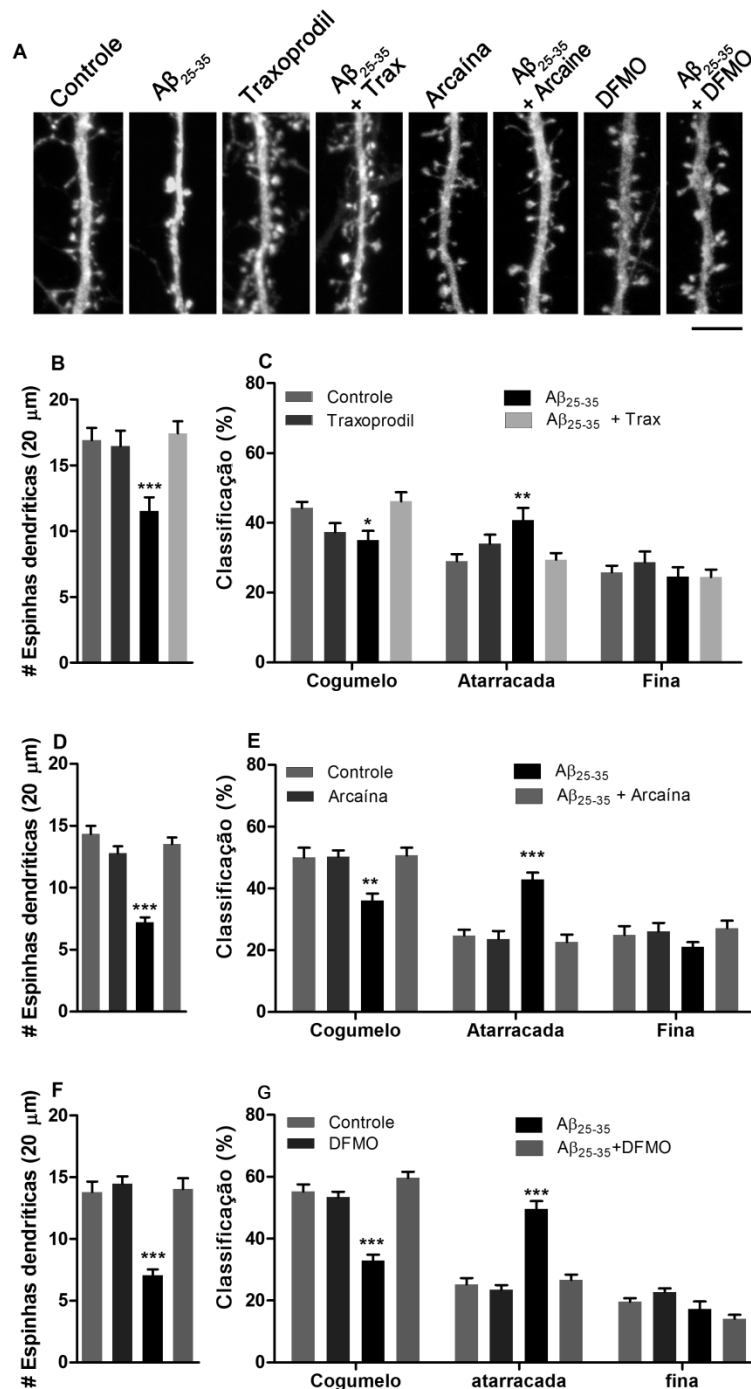
#### III.1.4. Modulação do sistema das poliaminas bloqueia as alterações no número e morfologia de espinhas dendríticas induzido por $A\beta_{25-35}$

Uma das consequências da ativação de receptores NMDA extrassinápticos é a redução de contatos sinápticos (Dieterich et al., 2008), assim, é plausível que os efeitos da aplicação de traxoprolil, arcaína e DFMO sobre os níveis nucleares de jacob também tenham reflexo na morfologia e densidade de espinhas dendríticas. Neste experimento, culturas neuronais transfectadas com eGFP, para melhor visualização da citoarquitetura neuronal, foram incubadas com  $A\beta_{25-35}$  (10  $\mu$ M) por 24 horas, o que resultou em uma diminuição significativa no número de espinhas dendríticas ( $P<0,05$ , Fig 12B, D F), bem como em alteração morfológicas, com a redução de espinhas do tipo-cogumelo e um aumento no número de espinhas espessas ( $P<0,05$ , Fig 12C, E, G). A aplicação de traxoprodil (4 nM) em culturas neuronais incubadas com  $A\beta_{25-35}$ , significativamente reverteu os efeitos deletérios deste peptídeo sobre o número de espinhas dendríticas (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,143)}=9,220$ ,  $p=0,0028$ , Fig. 12B). Ainda, traxoprodil também reverteu as alterações na morfologia das espinhas dendríticas induzida por  $A\beta$ , com aumento no número de espinhas cogumelo e redução de espinhas espessas (ANOVA de duas vias,  $F_{(3,139)}=9,634$ ,  $p<0,0001$ , Fig. 12C).

As alterações na densidade e morfologia de espinhas dendríticas induzidas por  $A\beta_{25-35}$  foram revertidas através do bloqueio do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA. Aplicação de arcaína (4  $\mu$ M) por 2 horas reverteu a redução do número de espinhas de neurônios incubados com  $A\beta_{25-35}$  (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,115)}=54,22$ ,  $p<0,0001$ , Fig. 12D), aumentou o número de espinhas tipo-cogumelo e reduziu o número de espinhas espessas (ANOVA de duas vias,  $F_{(3,116)}=29,12$ ,  $p<0,0001$ , Fig. 12E). Ademais, inibição da enzima ODC, através da aplicação de

DFMO (5  $\mu$ M), também bloqueou os efeitos deletérios sobre a densidade de espinhas (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,123)}=18,15$ ,  $p<0,0001$ , Fig. 11F) e morfologia (ANOVA de duas vias,  $F_{(3,126)}=74,6$ ,  $p<0,0001$ , Fig. 11G), resultantes da incubação de culturas neuronais com  $A\beta_{25-35}$ .





**Figura 12:** Traxoprodil (B, C), arcaína (D, E) ou DFMO (F, G) revertem as alterações no número e morfologia de espinhas dendríticas induzido por A $\beta_{25-35}$  em culturas de neurônios hipocampais. (A) Micrografias representativas retratando dendritos preenchidos com eGFP. Células foram incubadas com A $\beta_{25-35}$  por 24 horas e traxoprodil (4 nM), arcaína (4  $\mu$ M) ou DFMO (5  $\mu$ M) foram adicionados 2 horas antes da fixação. Densidade de espinhas e análise de sua morfologia foram realizados em segmentos de dendrito de 20  $\mu$ m. Espinhas foram classificadas de acordo com sua morfologia, visível no eixo X – Y. Barra de escala representa 5  $\mu$ m. Em cada experimento 30 a 48 segmentos de dendrito foram analisados. Dados apresentados como média + erro padrão. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$ , \*\*\* $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle.

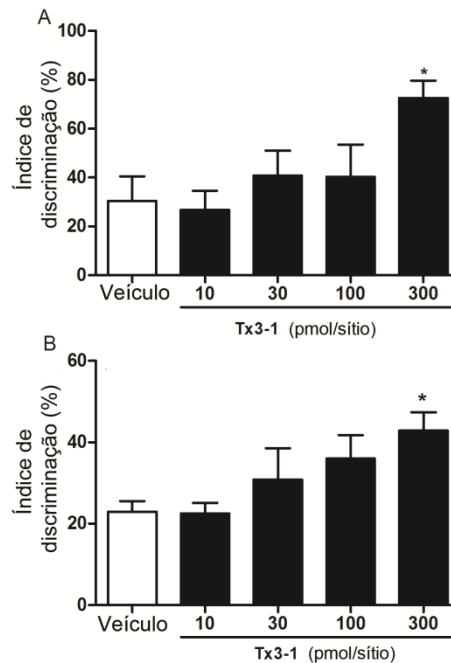
## **III.2. O bloqueador seletivo de correntes de $K^+$ Tx3-1 isolado do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* reverte o déficit cognitivo induzido pela injeção de $A\beta_{25-35}$ em camundongos**

Os resultados apresentados nesta sessão fazem parte de artigo científico apresentado no Capítulo V. Este trabalho foi realizado em colaboração com o laboratório chefiado pelo Prof. Dr. Marcus Vinícius Gomez, do programa de pós-graduação em farmacologia molecular, Universidade Federal de Minas Gerais.

### **III.2.1 Tx3-1 melhora memória de camundongos**

Com o intuito de avaliar o efeito da administração de Tx3-1 sobre a memória de curta e longa duração de camundongos, Tx3-1 foi administrada (i.c.v.) imediatamente após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos e a sessão de teste foi conduzida 2 ou 24 horas após a administração. O tempo de exploração dos objetos na sessão de treino foi similar para todos os grupos, demonstrando que os animais não possuíam preferência prévia por um dos objetos.

A administração de Tx3-1 (300 pmol/sítio) aumentou significativamente o índice de discriminação de camundongos testados na tarefa de reconhecimento de objetos quando comparados com o grupo controle, tanto para memória de curta duração (ANOVA de uma via,  $F_{(4,27)}=3,552$ ,  $p=0,0188$  Fig. 13A) como para memória de longa duração (ANOVA de uma via,  $F_{(4,45)}=4,265$ ,  $p=0,0052$  Fig. 13B).

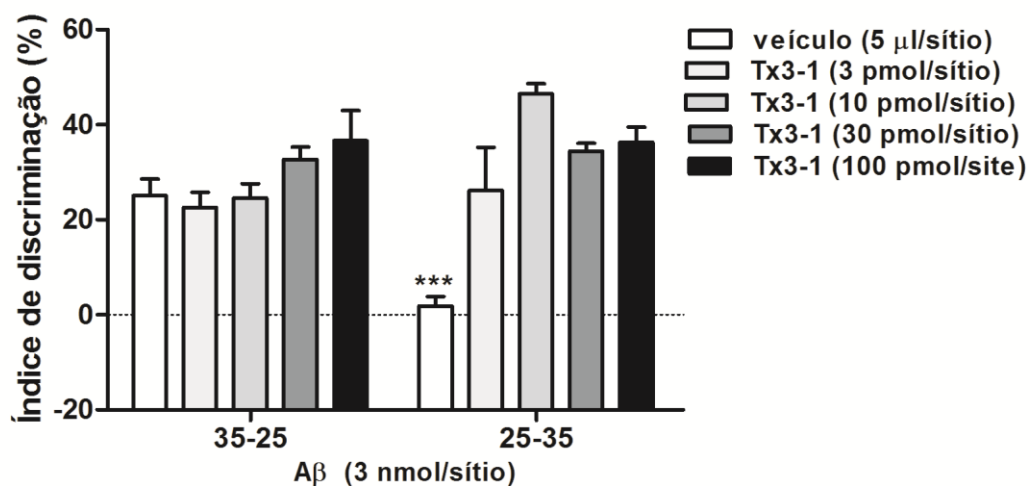


**Figura 13:** Administração i.c.v. de Tx3-1 (10-300 pmol/sítio) melhora a memória de curta (A) e longa duração (B) de camundongos testados na tarefa de reconhecimento de objetos. Memória de curta duração foi testada 2 horas após o treino e memória de longa duração foi testada 24 horas após o treino da tarefa de reconhecimento de objetos. Tx3-1 foi administrada imediatamente após o treino. Dados apresentados como média + erro padrão. N=6-14 animais por grupo. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

### III.2.2. Administração de Tx3-1 reverte prejuízo de memória induzido por $A\beta_{25-35}$

A seguir testou-se o efeito da administração de Tx3-1 sobre a memória de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$ . A injeção de  $A\beta_{25-35}$ , 7 dias antes da sessão de teste do reconhecimento de objetos, diminuiu significativamente o índice de discriminação quando comparado com o grupo injetado com  $A\beta_{35-25}$ , utilizado como controle (Figura 14). Além disso, a administração de Tx3-1 (i.c.v., 10 - 100 pmol/sítio) reestabeleceu o índice de discriminação de animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  para os mesmos níveis apresentados por animais controle. É interessante ressaltar que Tx3-1 demonstrou maior potência em melhorar a memória de animais injetados com

$A\beta_{25-35}$  [( $ED_{50} = 2.0$  (0,8 – 5,4 pmol/sítio)] que de animais controle (Fig. 13) [( $ED_{50} = 40.3$  (10,3 – 158,4 pmol/sítio)]. Análise estatística (ANOVA duas vias) demonstrou um efeito significativo do tratamento com Tx3-1 sobre o índice de discriminação de camundongos tratados com  $A\beta_{25-35}$  ( $F(3,43)=11.67$ ,  $p<0,0001$ , figura 14).



**Figura 14:** Administração i.c.v. de Tx3-1 reverte o prejuízo de memória induzido pela injeção de  $A\beta_{25-35}$  em camundongos testados na tarefa de reconhecimento de objetos. Tx3-1 (3-100 pmol/sítio) foi injetada imediatamente após o treino. N=6-8 animais por grupo. \*\* $P<0,001$  quando comparado com grupo  $A\beta_{35-25}$ .



## IV. Discussão

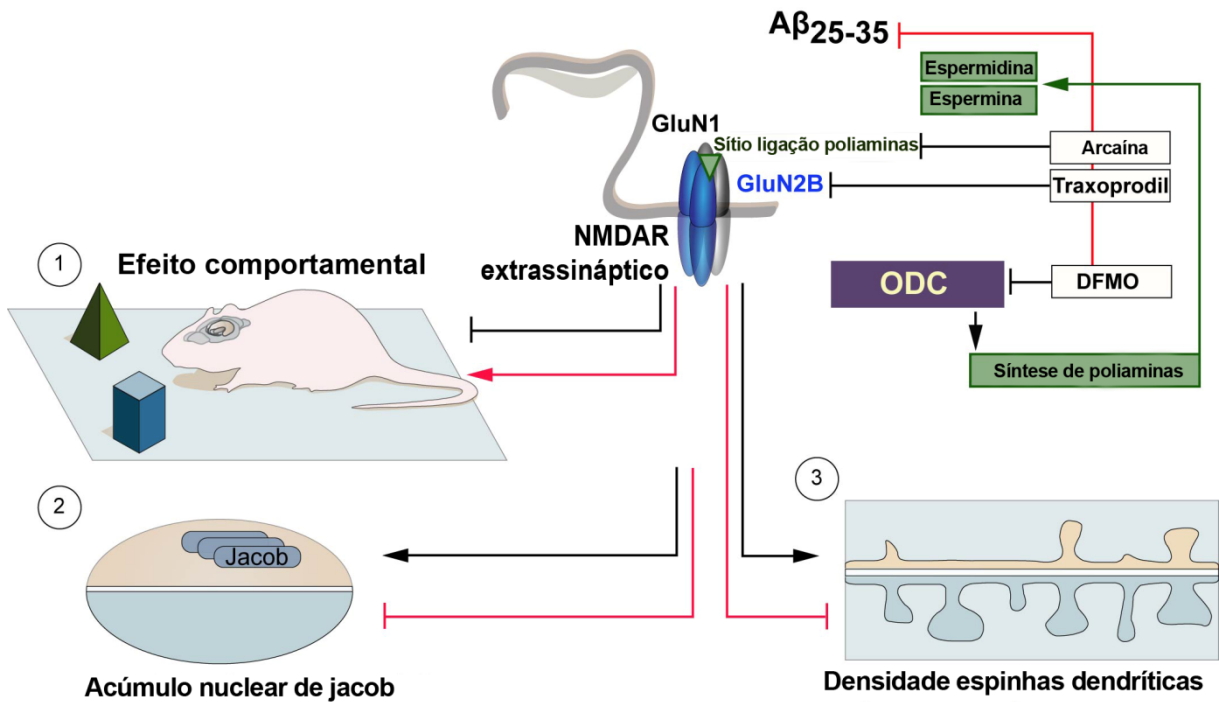
### IV.1. Modulação do sistema das poliaminas reverte o dano cognitivo induzido por $A\beta_{25-35}$ em camundongos: Envolvimento de receptores NMDA extrassinápticos

Alterações no sistema das poliaminas foram descritas tanto em pacientes com DA (Choi et al., 2001; Inoue et al., 2013; Mäkitie et al., 2010; Morrison & Kish, 1995; Morrison et al., 1998; Paik et al., 2006) como em modelos experimentais de DA (Yatin et al., 1997; Yatin et al., 2001), e apesar disso, restava elucidar qual o impacto destas alterações sobre a memória de animais submetidos ao modelo de DA. Neste estudo demonstrou-se que a modulação do sistema das poliaminas reverteu o prejuízo de memória induzido pela injeção de  $A\beta_{25-35}$  em camundongos testados na tarefa de reconhecimento de objetos. Ademais, o bloqueio do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR bloqueou o acúmulo nuclear de jacob induzido por  $A\beta$ , sugerindo o envolvimento de receptores NMDA extrassinápticos neste fenômeno. É interessante salientar que a modulação do sistema das poliaminas também reverteu os danos sinápticos induzidos por  $A\beta_{25-35}$ . Assim, sugere-se o envolvimento do sistema das poliaminas no déficit cognitivo induzido por  $A\beta_{25-35}$ , em um mecanismo onde: 1.  $A\beta_{25-35}$  aumenta a atividade da enzima ODC; 2. Aumento nos níveis de poliaminas induzido por  $A\beta$ ; 3. Poliaminas estimulam receptores NMDA extrassinápticos; 4. Ativação de receptores NMDA extrassinápticos reduz a densidade de espinhas dendríticas; 5. Déficit cognitivo é instalado (Figura 15).

Poliaminas, como espermidina e espermina, são moduladores positivos do receptor NMDA. O sítio de ligação das poliaminas neste receptor foi recentemente localizado, situando-se na fenda formada pelo dímero dos lóbulos inferiores da

região N-terminal das subunidades GluN1/GluN2B. Este dímero pode assumir dois estados conformacionais distintos: ativo ou dessensibilizado. A ligação de espermidina ou espermina estabiliza o dímero em seu estado ativo, aumentando a probabilidade de ligação do agonista (Kew & Kemp, 1998; Mony et al., 2011). Neste contexto é relevante destacar que a administração de espermidina melhora a memória de roedores em diferentes paradigmas experimentais (Gomes et al., 2010; Rubin et al., 2004; Velloso et al., 2009). Por outro lado, aqui demonstramos que a modulação do sistema das poliaminas, através do bloqueio de seu sítio de ligação no receptor NMDA, reverte o prejuízo de memória induzido pela administração i.c.v. de  $A\beta_{25-35}$  em camundongos. Tanto traxoprodil, antagonista da subunidade GluN2B, como arcaína, antagonista do sítio de ligação das poliaminas, reverteram o prejuízo de memória de camundongos testados na tarefa de reconhecimento de objetos. Esta tarefa envolve a ativação do córtex temporal, uma das primeiras áreas afetadas na DA (Dickerson & Einchenbaum, 2010), região onde foram encontrados níveis elevados de poliaminas em cérebro de pacientes com DA (Inoue et al., 2013; Morrison & Kish, 1995).

Neste estudo também se demonstrou que a administração de espermidina em animais tratados com arcaína ou DFMO e previamente injetados com  $A\beta_{25-35}$  (Figura 10), reinstala o déficit de memória induzido por  $A\beta$ . Estes dados sugerem que, nestes animais, um tônus poliaminérgico rege o processamento de novas memórias. Dessa maneira, animais injetados  $A\beta_{25-35}$  e tratados com arcaína ou DFMO tem um alívio temporal do tônus poliaminérgico, o que proporcionaria a aquisição de novas memórias. A injeção de espermidina nestes animais reestabelece este tônus, restaurando o déficit cognitivo.



**Figura 15:** 1) Prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$  é revertido através da modulação do sistema das poliaminas. Administração de traxoprodil, arcaína ou DFMO recuperam a memória de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$ . 2) O sítio de ligação das poliaminas no NMDAR extrassináptico pode estar envolvido no déficit cognitivo induzido por  $A\beta_{25-35}$ . Traxoprodil, arcaína e DFMO bloquearam o acúmulo nuclear de jacob em culturas de neurônios hipocâmpais. 3) Ativação de NMDAR extrassinápticos induz a perda de contatos sinápticos e redução de espinhas dendríticas. A perda de espinhas e alteração da sua morfologia induzido por  $A\beta_{25-35}$  é bloqueado através da modulação do sistema das poliaminas.

Dada sua importância para o funcionamento celular, é esperado que o tônus poliaminérgico estivesse sobre controle estrito, ditado pela atividade da enzima ODC. A injeção i.c.v. de  $A\beta_{25-35}$  aumentou a atividade dessa enzima, tanto no hipocampo como no córtex de camundongos. Também se demonstrou que a inibição da atividade da enzima ODC, através da administração de DFMO, reverteu o prejuízo de memória induzido por  $A\beta_{25-35}$  em camundongos. A atividade desta enzima, que é passo limitante no metabolismo de poliaminas, é controlada por ação da antienzima em conjunto com o inibidor da antienzima (AZIN). A antienzima é uma proteína regulatória que se liga a ODC formando um complexo inativo (Coffino, 2001). Mäkitie e colaboradores (2010) relataram o aumento na imunoreatividade do



AZIN no hipocampo de pacientes com DA, o que pode explicar o aumento na atividade da ODC encontrado no cérebro de pacientes com DA (Morrison & Kish, 1998). Ainda, este estudo relatou a colocalização de AZIN e o receptor NMDA em neurônios hipocampais (Mäkitie et al., 2010), sugerindo que AZIN regula a transmissão glutamatérgica, possivelmente pelo controle da produção local de poliaminas.

Neste estudo utilizou-se a injeção i.c.v. de  $A\beta_{25-35}$  com a intenção de mimetizar o déficit cognitivo presente na DA. Estudo recente demonstrou que o mesmo protocolo de agregação do peptídeo utilizado neste trabalho gera na sua grande maioria oligômeros de  $A\beta_{25-35}$  (Zussy et al., 2013). A fração 25-35 representa a região ativa do peptídeo  $A\beta$  completo (Pike et al., 1995), e pode induzir morte celular, perda de contatos sinápticos e prejuízo de memória (Yamada & Nabeshima, 2000; Zussy et al., 2013). Ademais, foi demonstrado que tanto o déficit cognitivo como o prejuízo da plasticidade sináptica induzidos por  $A\beta$  dependem da ativação de receptores NMDA (Kamenetz et al., 2003; Lo & Grossberg, 2011; Shankar et al., 2007), e que os efeitos tóxicos de sua ativação podem estar relacionados com a localização deste receptor na membrana neuronal, visto que diferentes cascatas de sinalização são ativadas através da estimulação de receptores NMDA sinápticos ou extrassinápticos (Hardingham & Bading, 2010; Karpova et al., 2013). Em neurônios, a ativação de receptores NMDA extrassinápticos induz a translocação de jacob para o núcleo, um evento seguido de redução no número de espinhas dendríticas e simplificação da arborização neuronal (Dieterich et al., 2008, Karpova et al., 2013). Enquanto oligômeros de  $A\beta_{1-42}$  induzem o acúmulo nuclear de jacob, ifenprodil, antagonista da subunidade GluN2B do receptor NMDA, bloqueia esse efeito (Rönicke et al., 2011). De forma semelhante, a aplicação de espermidina ou  $A\beta_{25-35}$

também induz o acúmulo de jacob no núcleo, um efeito bloqueado pela modulação do sistema das poliaminas. Assim, sugere-se que os efeitos benéficos advindos da modulação do sistema das poliaminas observados sobre a memória de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$  estejam relacionados com o bloqueio do sítio de ligação das poliaminas em receptores NMDA extrassinápticos. Entretanto, outros mecanismos podem estar envolvidos, uma vez que foi demonstrado que poliaminas podem promover a agregação do peptídeo  $A\beta$  em formas mais tóxicas, de monômeros para oligômeros (Luo et al., 2013).

Estudos demonstram que existe uma correlação entre a função cognitiva e alterações na morfologia de espinhas dendríticas. Na doença de Alzheimer, a redução no número de espinhas dendríticas está fortemente correlacionado com o declínio cognitivo (DeKosky & Scheff, 1990; Walsh & Selkoe, 2004). Somado a isso, mudanças na morfologia de espinhas estão coordenadas com sua função sináptica; enquanto o alongamento de espinhas está associado com a potenciação de longa duração, o encolhimento de espinhas ocorre mediante depressão de longa duração (Kasai et al., 2010). Assim, tanto a perda de espinhas dendríticas como a alteração na sua morfologia podem estar envolvidos no prejuízo cognitivo de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$ . A aplicação de  $A\beta_{25-35}$  em culturas primárias de neurônios hipocampais significativamente reduziu o número de espinhas dendríticas e induziu a redução de espinhas maduras (cogumelo) e o aumento de espinhas não funcionais (atarracadas). A modulação do sistema das poliaminas, através do bloqueio da sua síntese ou de seu sítio de ligação no receptor NMDA, reverteu os danos sinápticos induzidos por  $A\beta_{25-35}$ . Portanto, as poliaminas, por estimularem receptores NMDA extrassinápticos podem estar envolvidas na perda de contatos sinápticos e simplificação da morfologia neuronal que finalmente levaria ao prejuízo de memória.

Diferentes doenças neurológicas, como Parkinson (Lewandowski et al., 2010), esquizofrenia (Fiori and Turecki, 2008), depressão (Chen et al., 2010), e doença de Alzheimer (Inoue et al., 2013) possuem ao menos duas características em comum: 1. Disfunção do sistema glutamatérgico, 2. disfunção do sistema das poliaminas. Neste trabalho, demonstrou-se que a modulação do sistema das poliaminas reverte o dano cognitivo induzidos pela injeção de  $A\beta_{25-35}$  em camundongos. Merece atenção o fato que, uma vez estabelecidos, os danos cognitivos e sinápticos induzido por  $A\beta_{25-35}$  foram revertidos através do bloqueio do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, possivelmente extrassinápticos, sugerindo o potencial da modulação deste sistema como um alvo para intervenções farmacológicas.

#### **IV.2. O bloqueio de correntes de $K^+$ $I_A$ reverte o déficit cognitivo induzido por $A\beta_{25-35}$ em camundongos**

O veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* é uma fonte rica em peptídeos biologicamente ativos, entre eles a toxina Tx3-1, bloqueadora seletiva de correntes  $I_A$ . Os resultados deste estudo demonstraram que a administração i.c.v. de Tx3-1 melhorou tanto a memória de curta como a de longa duração de animais testados na tarefa de reconhecimento de objetos. Ademais, a administração de Tx3-1 reverteu o déficit de memória induzido pela injeção de  $A\beta_{25-35}$ .

Correntes de  $K^+$  do tipo A ( $I_A$ ) desempenham um papel importante no controle da excitação neuronal (Hoffman et al., 1997), através da regulação de potencial excitatório pós-sináptico e da amplitude de potenciais de ação retropropagadores (Chen et al., 2006; Ramakers & Storm, 2002). Assim, a modulação destas correntes

tem impacto direto em mecanismos de plasticidade sináptica. Chen e colaboradores (2006) demonstraram que correntes  $I_A$  hipocámpais definem o liminar de indução de LTP, visto que deleção de Kv4.2, que elimina correntes  $I_A$ , reduz o liminar de indução de LTP em um protocolo de disparos *theta* pareados. Além disso, a indução de LTP em culturas organotípicas de fatias de hipocampo provoca uma diminuição progressiva destas correntes (Jung & Hoffman, 2009). Considerando a LTP como um mecanismo celular para aquisição de memórias, é plausível sugerir que a modulação de correntes  $I_A$  tem impacto direto na capacidade de armazenamento de novas memórias. Dessa maneira, neste trabalho utilizaram-se técnicas comportamentais para demonstrar *in vivo* a melhora da memória induzida pelo bloqueio de correntes  $I_A$ .

Experimentos *in vitro* ajudam a compreender o envolvimento de correntes  $I_A$  no déficit cognitivo presente na DA (Kerrigan et al., 2008; Pan, 2004; Plant, 2006). O acúmulo de peptídeos  $A\beta$  interfere na plasticidade sináptica (Holscher et al., 2007; Cheng et al., 2009) e no funcionamento de canais iônicos, tais como canais de potássio (Furukawa et al., 1996). Ainda, evidências sugerem que o peptídeo  $A\beta$  pode modular correntes  $I_A$  (Kerrigan et al., 2008; Pan, 2004; Plant, 2006). A administração de Tx3-1, imediatamente após o treino, reverteu o prejuízo de memória induzido pela administração de  $A\beta_{25-35}$ . É interessante notar que Tx3-1 exibiu maior potência em animais injetados com  $A\beta_{25-35}$  quando comparado com grupo controle. Este maior efeito pode ser atribuído à maior expressão de canais de  $K^+$  no hipocampo e córtex de roedores injetados com  $A\beta_{25-35}$  (Pan et al., 2004). A maior potencia da Tx3-1 em animais injetados com  $A\beta$  faz dessa toxina um protótipo para o desenvolvimento de terapias mais efetivas no tratamento do declínio cognitivo presente na DA. A toxina Tx3-1 pode ser produzida através de um sistema de

expressão em bactérias (Carneiro et al., 2002), abrindo a possibilidade de produção não só de toxinas recombinantes mas também realizar mutações no peptídeo original.

Neste trabalho demonstrou-se o efeito da administração de Tx3-1, um bloqueador seletivo de correntes  $I_A$ , sobre a memória de animais naïve e injetados com  $A\beta$ . Além de experimentos *in vivo*, mais experimentos, como de técnicas de eletrofisiologia, são necessários para melhor compreender o efeito da toxina Tx3-1 sobre mecanismos neuronais de armazenamento de memórias.

### **IV.3. A inserção de canais de $K^+$ que permeiam correntes $I_A$ na membrana de células neuronais é dependente da ativação de receptores NMDA: possíveis efeitos sobre a função cognitiva de animais injetados com $A\beta_{25-35}$**

Diversos estudos demonstram o que parece ser uma ação coordenada entre a ativação de NMDAR e a inserção de canais de  $K^+$  do tipo A na membrana neuronal. Enquanto que a importância da transmissão glutamatérgica para o processamento mnemônico é reconhecida (Malenka & Bear, 2004) a influência de correntes de  $K^+$   $I_A$  sobre esses processos ainda não é totalmente compreendida. Chen e colaboradores (2006) demonstraram que o nocaute do canal Kv4.2 diminui o limiar para indução de LTP. Contrariamente, o aumento da expressão de Kv4.2 previne a indução de LTP (Jung et al., 2008). Já a inserção de Kv4.2 na membrana neuronal depende do seu estado de fosforilação: a fosforilação de Kv4.2 reduz a inserção do canal na membrana neuronal, e o contrário ocorre quando o canal é defosforilado (Lugo et al., 2008). Ainda, parece ocorrer uma regulação bidirecional

entre a ativação de correntes  $I_A$  e a composição de receptores NMDA sinápticos (Jung et al., 2008).

Em uma série elegante de experimentos, Mulholland e Chandler (2010) demonstraram como a ativação de receptores NMDA sinápticos ou extrassinápticos controla a inserção de canais Kv4.2 na membrana neuronal. Neste estudo, o influxo de  $Ca^{2+}$  proveniente da ativação de receptores NMDA sinápticos induz a fosforilação de Kv4.2 e sua subsequente endocitose. Por outro lado, tanto a ativação de receptores NMDA extrassinápticos como o bloqueio da captação de glutamato induziram a defosforilação de Kv4.2, aumentando sua inserção na membrana.

De certa forma estes dados da literatura congregam os achados apresentados nesta tese. Neste contexto, o bloqueio de receptores NMDA extrassinápticos através da administração de traxoprodil e arcaína levaria a redução de canais de  $K^+$  que permeiam correntes  $I_A$  na membrana neuronal, um mecanismo que facilitaria a indução de LTP (Mulholland & Chandler, 2010). Por outro lado, o bloqueio de correntes  $I_A$ , através da administração de Tx3-1, pode induzir um aumento na inserção de NMDAR sináptico (Jung et al., 2008), o que também facilitaria a indução de LTP. Assim, mecanismos distintos, mas concatenados, poderiam promover a melhora de memória de camundongos injetados com  $A\beta_{25-35}$  observada neste estudo.

#### IV. 4. Conclusões e Perspectivas

Os achados deste estudo permitem concluir que:

- O bloqueio do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR reverte o déficit cognitivo induzido por  $A\beta_{25-35}$  em camundongos.
- O bloqueio da síntese de poliaminas, através da administração de DFMO, reverte o déficit cognitivo induzido por  $A\beta_{25-35}$  em camundongos.
- O bloqueio de correntes de  $K^+$  do tipo A reverte o déficit cognitivo induzido por  $A\beta_{25-35}$  em camundongos.
- A aplicação de bloqueadores do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR reverte o acúmulo nuclear de jacob induzido por  $A\beta_{25-35}$  em cultura primária de hipocampo.
- O bloqueio da síntese de poliaminas reverte o acúmulo nuclear de jacob induzido por  $A\beta_{25-35}$  em cultura primária de hipocampo.
- O bloqueio do sítio de ligação das poliaminas no NMDAR reverte a perda e a alteração na morfologia de espinhas dendríticas induzido por  $A\beta_{25-35}$  em cultura primária de hipocampo.
- O bloqueio da síntese de poliaminas reverte a perda e a alteração na morfologia de espinhas dendríticas induzido por  $A\beta_{25-35}$  em cultura primária de hipocampo.

Os resultados apresentados abrem espaço para novas hipóteses, fazendo com que mais experimentos sejam necessários para melhor elucidar o envolvimento do sistema das poliaminas nas alterações cognitivas presentes na Doença de Alzheimer. A saber:

- Utilização de modelos mais relevantes para a DA, como animais transgênicos expressando mutações relacionadas com a DA, ou o uso de preparações de A $\beta$  mais relevantes, como oligômeros.
- Estudos de biologia molecular para identificar alterações na expressão de proteínas chave do sistema de poliaminas em cérebro de camundongos submetidos a um modelo de DA.
- Estudos comportamentais com animais transgênicos para proteínas relacionadas com o sistema das poliaminas, com a intenção de verificar alterações cognitivas induzidas por modelo de DA.
- Ensaio de eletrofisiologia para verificar o efeito da toxina Tx3-1 sobre correlatos celulares do aprendizado e memória, como LTP e LTD.



#### IV.5. Referências Bibliográficas

Aisen PS, Andrieu S, Sampaio C, Carrillo M, Khachaturian ZS, Dubois B et al, 2011. Report of the task force on designing clinical trials in early (predementia) AD. *Neurology* 76(3):280-6.

Peters A & Kaiserman-Abramof IR, 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. the perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat*, 127(4):0\_321, 1970.

Antunes M, Biala G, 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, 13(2):93-110.

Arendt, T, 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 118:167-179.

Behnisch T, YuanXiang P, Bethge P, Parvez S, Chen Y, Yu J et al. 2011. Nuclear translocation of Jacob in hippocampal neurons after stimuli inducing long-term potentiation but not long-term depression. *PLoS ONE* 2011;6(2): e17276.

Berg L & Morris JC. Diagnosis. In: Alzheimer disease. Terry RD, Katzman R, Bick KL, editors. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven; 1996: 9-26.

Bernstein HG & Müller M, 1999. The cellular localization of the L-ornithine decarboxylase/polyamine system in normal and diseased central nervous system. *Prog Neurobiol*, 57:485-505

Blackstone C & Sheng M, 2002. Postsynaptic calcium signaling microdomains in neurons. *Front Biosci*, 7:d872-85.

Bordji K, Becerril-Ortega J, Buisson A, 2011. Synapses, NMDA receptor activity and neuronal A $\beta$  production in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*, 22(3): 285-294.

Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Bussion A, 2010. Activation of extrasynaptic, but not synaptic NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- $\beta$  production. *J Neurosci* 30:15927-15942

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

Brouillette J, Caillierez R, Zommer N, Alves-Pires C, Benilova I, Blum D et al., 2012. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid- $\beta_{1-42}$  oligomers are revealed *in vivo* by using a novel animal model. *J Neurosci*, 32(23):7852-7861

- Carneiro AMD, Kushmerick C, Koenen J, Arndt MHL, Cordeiro MN, Chavez-Olortegui C et al., 2002. Expression of functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*. 41 – 305 – 313.
- Che QS, Kagan BL, Hirakura Y, Xie CW, 2000. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *J Neurosci Res*, 60, 64-72.
- Chen GG, Fiori LM, Moquin L, Gratton A, Mamer O, Mechawar N et al. 2010. Evidence of altered polyamine concentrations in cerebral cortex of suicide completers. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(7): 1477 – 84.
- Chen X, Yuan L, Zhao C, Birnbaum SG, Frick A, Jung WE et al., 2006. Deletion of *Kv4.2* gene eliminates dendritic A-type K<sup>+</sup> current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 26(47):12143-12151.
- Cheng L, Yin WJ, Zhang JF, Qi JS, 2009. Amyloid  $\beta$ -protein fragments 25-35 and 31-35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo. *Synapse*, 63:206 – 214.
- Choi MH, Kim KR, Kim IS, Lho DS, Chung BC, 2001. Increased hair polyamine levels in patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 50:128.
- Coetzee WA, Amarill Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T et al., 1999. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann NY Acad Sci* 868:233-285.
- Coffino P, 2000. Polyamines in spermiogenesis: not now, darling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(9):4421-4423.
- Coffino P, 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Mol Cell Biol*, 2: 188 – 94.
- Cordeiro MdoN, de Figueiredo SG, Valentim AdoC, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J et al., 1993. Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, 31:35-42.
- Dalmolin GD, Silva CR, Rigo FK, Gomes GM, Cordeiro Mdo N, Richardson M et al. 2011. Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. *Pain*, 152(10):2224-32.
- Davidson M, Zemishlany Z, Mohs RC, Horvath TB, Powchik P, Blass JP et al., 1988. 4-Aminopyridine in the treatment of Alzheimer's disease. *Biol Psychiat*, 23, 485 – 490.
- Davies CA, Mann DMA, Sumpter PQ, Yates, PO, 1987. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 78:151-164.
- Decker H, Jürgensen S, Adrover MF, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Klein WL et al., 2010. N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- $\beta$  peptide oligomers. *J Neurochem*, 115(6):1520-9.

- DeKosky ST & Scheff SW, 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*, 27: 457-64.
- Dickerson BC & Eichenbaum H, 2010. The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35: 86-104.
- Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, König I, Landwehr M et al. 2008. Caldendrin-Jacob: A protein liaison that couples NMDA receptor signaling to the nucleus. *PLOS Biol.* 2008;6(2): 286-306.
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R, 1999. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:13438-13443.
- Ferreira ST & Klein WL, 2012. The A $\beta$  oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*, 96: 529 – 43.
- Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, Ribeiro FV, Costa CV, Melo HM et al., 2013. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight a $\beta$  oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. *J Neurosci*, 5;33(23):9626-34.
- Fiori LM & Turecki G, 2008. Implication of the polyamine system in mental disorders. *J Psychiatr Neurosci*, 33(2): 102 – 10.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A, 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 20, 847–854.
- Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB, 1997. Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *Trends Neurosci*, 20, 67-72.
- Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP, 1996. Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature*, 379:74-78.
- Glennner GG & Wong CW, 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120(3):885-890.
- Gomes GM, Mello CF, da Rosa MM, Bochi GV, Ferreira J, Barron S et al. 2010. Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 93(4): 589-95.
- Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA, 2002. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol*, 22:579-588.
- Gruden MA, Davidova TB, Malisauskas M, Sewell RD, Voskresenskaya NI, et al., 2007. Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: Autoantibodies to Ab(25-35) oligomers, S100B and neurotransmitters. *J Neuroimmunol*, 186: 181 – 92.

- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM, 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, 261(13): 6084-6089.
- Gugliucci A, 2004. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta*, 344, 23-35.
- Hardingham GE & Bading H, 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signaling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci Rev*, 11:682-696.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H, 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, 5(5):405-414.
- Hayashi-Takagi A, Takaki M, Graziane N, Seshadri S, Murdoch H, Dunlop AJ, et al., 2010. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat Neurosci*, 13(3):327-32.
- Hering H & Sheng M, 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, 2(12):880-8.
- Hille B, 2001. Ionic channels of excitable membranes. Third ed. Sinauer, Sunderland.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D, 1997. K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, 387:869 – 875.
- Holscher C, Gengler S, Gault VA, Harriott P, Mallot HA, 2007. Soluble beta-amyloid[25-35] reversibly impairs hippocampal synaptic and spatial learning. *Eur J Pharm*, 561(1-3):85-90.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR, 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 45:583 – 595.
- Inoue k, Tsutsui H, Akatsu H, Hashizume Y, Matsukawa N, Yamamoto T et al., 2013. Metabolic profiling of Alzheimer's disease brains. *Sci Rep*, 6;3:2364.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, 1993. The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann NY Acad Sci*, 695:144-148.
- Johnson TD, 1996. Modulation of channel function by polyamines. *Trends Pharmacol Sci*, 17, 22-7.
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, DeFelipe J, Yuste R, 2007. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci*, 1(1):131-43.
- Jung SC & Hoffman DA, 2009. Biphasic somatic A-type K channel downregulation mediates intrinsic plasticity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS One*, 4(8):e6549.

- Jung SC, Kim J, Hoffman DA, 2008. Rapid, bidirectional remodeling of synaptic NMDA receptor subunit composition by A-type K<sup>+</sup> channel activity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, 60(4):657-71.
- Kahana C, 2009. Antizyme and antizyme inhibitor, a regulatory tango. *Cell Mol Life Sci*, 66:2479 -2488.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T et al., 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron*, 37: 925-37.
- Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA, 2010. Subcellular and metabolism examination of amyloid- $\beta$  peptides in Alzheimer disease pathogenesis: Evidence for A $\beta$ <sub>25-35</sub>. *Exp Neurol*, 221: 26-37.
- Kapitein LC, Yau KW, Gouveia SM, van der Zwan WA, Wulf PS, Keijzer N et al. 2011. NMDA receptor activation suppresses microtubule growth and spine entry. *J Neurosci*, 1;31(22): 8194 – 209.
- Karpova A, Mikhaylova M, Bera S, Bär J, Reddy PP, Behnisch T et al. 2013. Encoding and transducing the synaptic or extrasynaptic origin of NMDA receptor signals to the nucleus. *Cell*, 28;152(5): 1119-33.
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci*, 33: 121-29.
- Kerrigan TL, Atkinson L, Peers C, Pearson HA, 2008. Modulation of “A”-type K<sup>+</sup> current by rodent and human forms of amyloid beta protein. *Neuroreport*, 28;19(8):839 – 843.
- Kew JN & Kemp JA, 1998. An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurons. *J Physiol*, 412(1): 17-28.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting guidelines working group, 2010. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*, 160(7):1577-9.
- Kim J & Hoffman DA, 2008. Potassium channels: New found players in synaptic plasticity. *Neuroscientist*, 14(3), 276 – 286.
- Kindler S, Dieterich DC, Schütt J, Sahin J, Karpova A, Mikhaylova M et al., 2009. Dendritic mRNA targeting of Jacob and NMDA-induced nuclear translocation after Calpain-mediated proteolysis. *J Biol Chem*, 284, 25431-25440.
- Kitani T & Fujisawa H, 1989. Purification and characterization of antizyme inhibitor of ornithine decarboxylase from rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 991:44-49
- Kleckner NW & Dingledine R, 1988. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241(4867):853-7.
- Kubo T, Nishimura S, Kumagae Y, Kaneko I, 2002. In vivo conversion of racemized b-amyloid ([D-Ser 26]Ab 1–40) to truncated and toxic fragments ([DSer 26] Ab 25–35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer’s patients. *J Neurosci Res*, 70: 474–483.

- Kurup P, Zhang Y, Venkitaramani DV, Xu J, Lombroso PJ, 2010. The role of STEP in Alzheimer's disease. *Channels (Austin)*, 4:347-350
- Kushmerick C, Kalapothakis E, Beirão PSL, Penaforte CL, Prado VF, Cruz JS et al., 1999. *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K<sup>+</sup> currents controlling Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency in GH<sub>3</sub> cells. *J Neurochem*, 72, 1472 – 1481.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M et al., 2007. Aβ oligomers-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 27(4):796-807.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M et al., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ<sub>1-42</sub> are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 6448 – 53.
- Laursen SE & Belknap JK, 1986. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Method*, 16, 355 – 357.
- Lewandowski NM, Ju S, Verbitsky M, Ross B, Geddie ML, Rockenstein E, et al. 2010. Polyamine pathway contributes to the pathogenesis of Parkinson disease. *P Natl Acad Sci USA*, 28;107(39): 16970 – 75.
- Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hebert R, Helliwell B, Hill GB and McDowell I (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol*, 156(5): 445-453.
- Lo D & Grossberg GT, 2011. Use of memantine for the treatment of dementia. *Expert Rev Neurother*, 11(10): 1359-70.
- Lugo JN, Barnwell LF, Ren Y, Lee WL, Johnston LD, Kim R et al., 2008. Altered phosphorylation and localization of the A-type channel, Kv4.2 in status epilepticus. *J Neurochem*, 106(4):1929-40.
- Luo J, Yu CH, Yu H, Borstnar R, Karmelin SC, Gräslund A et al., 2013. Cellular polyamines promote amyloid-beta (aβ) peptide fibrillation and modulate the aggregation pathways. *ACS Chem Neurosci*, 20;4(3): 454-62.
- Mäkitie LT, Kanerva K, Polvikoski T, Paetau A, Andersson LC, 2010. Brain neurons express ornithine decarboxylase-activating antizyme inhibitor 2 with accumulation in Alzheimer's Disease. *Brain Pathol*, 20(3):571-80.
- Malenka RC & Bear MF, 2004. LTP and LTD: and embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1):5-21.
- Marton LJ & Pegg AE, 1995. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 55-91.
- Masdeu JC, Kreisl WC, Berman KF, 2012. The neurobiology of Alzheimer disease defined by neuroimaging. *Curr Opin Neurol*, 25(4):410-20.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K, 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *P Natl Acad Sci USA*, 82(12)4245-4249.

- Maurice T, Lockhart BP, Privat A, 1996. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*, 706: 181–93.
- McKinney RA, 2010. Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodeling. *J Physiol*, 588(Pt 1):107-16.
- Migliore M & Shepherd GM, 2002. Emerging rules for the distribution of active dendritic conductance. *Nat Rev Neurosci*, 3, 362 – 370.
- Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack, G, 2002. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res*, 958, 210-21.
- Moinard C, Cynober L, de Bandt JP, 2005. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr*, 24, 184-97.
- Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Poletti P, 2009. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, 157(8):1301-17.
- Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P, 2011. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B receptors by polyamines. *EMBO J*, Jun 17;30(15):3134-46.
- Morgan DM, 1999. Polyamines. An overview. *Mol Biotechnol*, 11, 229-50.
- Morrison LD & Kish SJ, 1995. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 197: 5-8.
- Morrison LD, Bergeron C & Kish S, 1993. Brain S-adenosylmethionine decarboxylase activity is increased in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 154: 141-144.
- Morrison LD, Cao XC, Kish SJ, 1998. Ornithine decarboxylase in human brain: influence of aging, regional distribution, and Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 71: 288-94.
- Mota SI, Ferreira IL, Rego AC, 2013. Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease – A focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology*, Aug 22, doi:pil: S0028-3908(13)00378-X. 10.1016/j.neuropharm.2013.08.013. [Epub ahead of print].
- Mulholland PJ & Chandler LJ, 2010. Inhibition of glutamate transporters couples to Kv4.2 dephosphorylation through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuroscience*, 165(1):130-7.
- Mayeux R & Sano M, 1999. Treatment of Alzheimer's disease. *New Eng J Med*, (25): 1670 – 1679.
- Nilsson T, Bogdanovic N, Volkman I, Winblad B, Folkesson R, Benedikz E, 2006. Altered subcellular localization of ornithine decarboxylase in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Commun*. 2;344(2):640-6.
- Olivares D, Deshpande VK, Shi Y, Lahiri DK, Greig NH, Rogers JT et al. 2012. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for

- Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *Curr Alzh Res*, 9(6): 746-58.
- Paik MJ, Lee S, Cho KH, Kim KR, 2006. Urinary polyamines and N-acetylated polyamines in four patients with Alzheimer's disease as their N-ethoxycarbonyl-N-pentafluoropropionyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Anal Chim Acta*, 576: 55-60.
- Pan Y, Xu X, Tong X, Wang X, 2004. Messenger RNA and protein expression analysis of voltage-gated potassium channels in the brain of A $\beta$ <sub>25-35</sub>-treated rats. *J Neurosci, Res*. 77:94 – 99.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q, 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 14(6):383-400.
- Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE, 2005. Nuclear Ca<sup>2+</sup> and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci*, 25:4279–4287.
- Pegg AE & McCann PP, 1982. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol*, 243, C212-21.
- Penney JB, Maragos WF, Greenamyre JT, Debowey DL, Hollingsworth Z, Young AB, 1990. Excitatory amino acid binding sites in the hippocampal region of Alzheimer's disease and other dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 53, 314–320.
- Perez-Leal O & Merali S, 2012. Regulation of polyamine metabolism by translational control. *Amino Acids*, 42:611-617.
- Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, et al. 1995. Structure-activity analyses of b-amyloid peptides: Contributions of the  $\beta$ <sub>25-35</sub> region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem*, 64: 253–265.
- Plant LD, Webster NJ, Boyle JP, Ramsden M, Freier DB, Peers C et al., 2006. Amyloid  $\beta$  peptide as a physiological modulator of "A"-type K<sup>+</sup> currents. *Neurobiol Aging*, 27, 1673 – 1683.
- Poulin RL, Coward JK, Lakanen JR, Pegg AE, 1993. Enhancement of the spermidine uptake system and lethal effects of spermidine overaccumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells under hyposmotic stress. *J Biol Chem*, **268**, 4690–4698.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J, 2006. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, **26** (27): 7212–21
- Prince M & Jackson J, 2009. World Alzheimer's Report. London. Alzheimer's Disease International. 2009.
- Prince M, Bryce R, Ferri C, 2009. World Alzheimer Report – The benefits of early diagnosis and intervention. Alzheimer's Disease international, London.



- Ramakers GM & Storm JF, 2002. A transient postsynaptic K<sup>+</sup> current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *P Natl Acad Sci USA*, 99, 10144 – 10149.
- Ramón y Cajal S, 1894. The Croonian lecture. La fine structure des centres nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London*. vol. LV. Harrison and Sons, London, pp 444–468.
- Ransom RW & Stec NL, 1988. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem*, 51, 830-6.
- Reisberg B, Doody R, Stöfler A, 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 348(14):1333-1341.
- Roberson ED & Mucke L, 2006. 100 years and counting: Prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* 3;314(5800): 781-4.
- Rock DM & Macdonald RL, 1995. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Ann Rev Pharmacol Tox*, 35, 463-82.
- Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL, 2008. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS ONE*, 3(4):e1997.
- Rönicke R, Mikhaylova M, Rönicke S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M et al. 2011. Early neuronal dysfunction by amyloid  $\beta$  oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging*, 32(12): 2219-28.
- Rowland LM, Astur RS, Jung RE, Bustillo JR, Lauriello J, Yeo RA, 2005. Selective cognitive impairments associated with NMDA receptor blockade in humans. *Neuropsychopharmacology*, 30(3):633-9.
- Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeir JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TL et al. 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulate fear conditioning in rats. *J Neurosci*, 3;24(9): 2328-34.
- Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW, 2013. Diversity in NMDA receptor composition: Many regulators, many consequences. *Neuroscientist*, 19(1):62 – 75.
- Schmeisser MJ, Ey E, Wegener S, Bockmann J, Stempel AV, Kuebler A et al., 2012. Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature*, 486(7402):256-60.
- Schoonenboom MS, Mulder C, Van Kamp GJ, Mehta SP, Scheltens P, Blankenstein MA et al., 2005. Amyloid beta 38, 40 and 42 species in cerebrospinal fluid: more of the same? *Ann Neurol*, 58(1):139-142.
- Seidl R, Beninati S, Cairns N, Singwald N, Risser D, Bavan H et al., 1996. *Neurosci Lett*, 15;206(2-3):193-5.
- Selkoe DJ, 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, (298):789-791.

- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL, 2007. Natural oligomers of the alzheimer amyloid- $\beta$  protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*, 27(11):2866-2875
- Shepherd GM, 1996. The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. *J Neurophysiol*, 75:2197-2210.
- Silva MA, Klafke JZ, Rossato MF, Gewehr C, Guerra GP, Rubin MA et al. 2011. Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain. *Biochem Pharmacol*, 1;82(3): 269-77.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY et al., 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, 8:1051-1058
- Stephan A, Laroche S, Davis S, 2001. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci*, 21, 5703-5714.
- Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S et al., 2013. A $\beta$  induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation and synaptic loss. *P Natl Acad Sci USA*, 110(27):E2518-27.
- Tekirian TL, 2001. A $\beta$  N-terminal isoforms: Critical contributors in the course of Alzheimer's disease pathophysiology. *J Alzheimers Dis*, 3: 241 – 48.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R, 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30(4):572-80.
- Teti D, Visalli M, McNair H, 2002. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 781, 107-49.
- Urdiales JL, Medina MA, Sanchez-Jimenez F (2001) Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 1015-9
- Velloso NA, Dalmolin GD, Gomes GM, Rubin MA, Canas PM, Cunha RA et al. 2009. Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. *Neurobiol Learn Mem*, 92(4) 574-80.
- Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G, 2006. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener*, 1, 4.
- Walsh DM & Selkoe DJ, 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*, 44: 181-93.
- Wang D, Noda Y, Zhou Y, Mouri A, Mizoguchi H, Nitta A et al. 2007. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid<sub>25-35</sub> i.c.v.-injected mice: Involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology* 32: 1261–71.

- Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R, 2004. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci*, 24, 3370-3378.
- Williams K, 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J*, 325 (Pt 2), 289-97.
- Wiseman EJ, Jarvik LF, 1991. Potassium channel blockers: could they work in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 5, 25 – 30.
- Yamada K, Nabeshima T, 2000. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther*, 88: 93–113.
- Yang K, Belrose J, Trepanier CH, Lei G, Jackson MF, Macdonald JF, 2011. Fyn, a potential target for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 27(2):243-52.
- Yang K, Trepanier C, Sidhu B, Xie YF, Li H, Lei G, et al., 2012. Metaplasticity gated through differential regulation of GluN2A versus GluN2B receptors by Src family kinases. *EMBO J*, 21(4):805-16.
- Yatin SM, Yatin M, Aulick T, Ain KB, Butterfield DA, 1997. Alzheimer's amyloid beta-peptide associated free radicals increase rat embryonic neuronal polyamine uptake and ornithine decarboxylase activity: protective effect of vitamin E *Neurosci Lett*, 263: 17-20.
- Yatin SM, Yatin M, Varadarajan S, Ain KB, Butterfield DA, 2001. Role of spermine in amyloid beta-peptide-associated free radical-induced neurotoxicity. *J Neurosci Res*, 63: 395-401.
- Zhang H, Ma Q, Zhang Y, Xu H, 2012. Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J Neurochem*, 120(1):9-21.
- Zussy C, Brureau A, Keller E, Marchal S, Blayo C, Delair B, et al. 2013. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- $\beta$  peptide injection in rats. *PLOS One* 2013; 8(1): e53117.



## V. Produção Relacionada

### V.1. Artigo 1

Manuscrito submetido à publicação na revista *Neuropharmacology*, em fase de revisão.

#### **Modulation of polyamine system counteracts $\beta$ -amyloid peptide-induced memory impairment in mice: Involvement of extrasynaptic NMDA receptors**

Guilherme Monteiro Gomes<sup>a,b</sup>, Gerusa Duarte Dalmolin<sup>a</sup>, Julia Bär<sup>b</sup>, Anna Karpova<sup>b</sup>, Carlos Fernando Mello<sup>c</sup>, Michael R. Kreutz<sup>b,d</sup>, Maribel Antonello Rubin<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup>Graduation Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry. Building 18, room 2203. Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

<sup>b</sup>Research Group Neuroplasticity, Leibniz-Institute for Neurobiology. Brenneckstrasse 6, 39118. Magdeburg, Germany.

<sup>c</sup>Graduation Program in Pharmacology. Building 21, room 5218. Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

<sup>d</sup>German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE). Leipziger Strasse 44, haus 15, 39120, Magdeburg, Germany.

\*Correspondence: Maribel Antonello Rubin, Av Roraima, 1000, prédio 18, sala 2206, Camobi. CEP: 97105900, Santa Maria, RS, Brazil. Fax: + 55 55 3220 8978.

E-mail: maribel.rubin@gmail.com

## ABSTRACT

In Alzheimer's disease (AD),  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) has been linked with synaptic loss and cognitive dysfunction, albeit the precise mechanism remains unknown. An involvement of N-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDAR) in AD is proposed, since its inhibition attenuates some aspects of AD's neuropathology. In this regard, polyamines, like spermidine and spermine, positive modulators of NMDARs, have been shown to have both concentration and synthesis increased by  $A\beta$ . Using the novel object recognition task we showed that negative modulation of polyamine system, been trough blockade of its binding site at NMDAR by arcaine (0.02 nmol/site), or inhibition of polyamine synthesis by DFMO (2.7 nmol/site), reverses  $A\beta_{25-35}$ -induced memory impairment in mice. The activation of polyamine binding site at NMDAR located at extrasynaptic sites might underlie the cognitive deficits of  $A\beta_{25-35}$ -treated mice, since incubation of hippocampal neuron cultures with spermidine (400  $\mu$ M) or  $A\beta_{25-35}$  (10  $\mu$ M) significantly increased protein jacob localization in the nucleus, a marker of extrasynaptic NMDAR activation. Moreover, traxoprodil (4nM), arcaine (4  $\mu$ M) or DFMO (5  $\mu$ M) blocked the  $A\beta$ -induced jacob nuclear translocation. Activation of extrasynaptic NMDAR in neurons leads to striping of synaptic contacts and simplification of neuronal cytoarchitecture. Incubation of hippocampal neuron cultures with traxoprodil (4 Nm), arcaine (4  $\mu$ M) or DFMO (5  $\mu$ M) reversed the deleterious effects of  $A\beta_{25-35}$  on dendritic spine number and spine morphology. The reversal of memory impairment and the protective effect on dendritic spine alterations exerted by the modulators of the polyamine system suggest the polyamine binding site at extrasynaptic NMDAR a potential player in  $A\beta$ -induced cognitive deficit.

**Keywords:** Polyamines; Alzheimer's disease; Memory; Novel object recognition; ornithine decarboxylase.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent form of dementia in the elder population (Prince and Jackson, 2009). It is characterized by a progressive decline of cognitive function and accumulation of neurofibrillary tangles, formed by phosphorylated *tau* protein and senile plaques formed by amyloid- $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) accumulation (Roberson and Mucke, 2006). Evidence suggests that the toxic effects of A $\beta$  may be mediated, in part, by activation of NMDARs (Rönicke et al., 2011; Talantova et al., 2013), since its inhibition attenuates some aspects of AD neuropathology (Olivares et al., 2012).

Polyamines, such as spermidine and spermine, are aliphatic amines that function as positive modulators of NMDAR, binding at the lower lobe of the N-terminal domain of GluN1 and GluN2B dimer interface (Mony et al., 2011). Addition of A $\beta$  peptide to neuronal cultures increases polyamine levels, leading to NMDARs activation (Yatin et al., 1997; Yatin et al., 2001). Moreover, increased ornithine decarboxylase (ODC) activity, the main step in polyamine synthesis, was shown in hippocampal neuron cultures incubated with A $\beta$  peptide (Yatin et al., 1997). Polyamines were also found increased in brain of AD patients (Morrison and Kish, 1995). Although upregulation of polyamine system in AD and AD-like conditions were reported, it remains to be elucidated whether the alterations in this system are linked to the A $\beta$ -induced cognitive decline.

Here we investigate the involvement of polyamine system on A $\beta$ -induced memory impairment in mice. We found that negative modulation of polyamine system counteracts the A $\beta$ -induced memory impairment in mice submitted to the novel object recognition task. Furthermore, using an *in vitro* extrasynaptic NMDAR stimulation protocol, we show that while A $\beta$  increases nuclear localization of protein jacob, a marker of extrasynaptic NMDAR activation, negative modulation of polyamine system blocks this effect. Negative modulation of polyamine system also counteracted the synaptic loss and dendritic spine morphology alterations induced by A $\beta$ . These results suggest the involvement of polyamine system in A $\beta$ -

induced cognitive deficits and the polyamine binding site at extrasynaptic NMDAR as a potential target for drug interventions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Swiss mice (3 month old) were used for the behavioral experiments. They were housed in plastic cages, with free access to water and food (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil), and were maintained on a 12h/12h light-dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00). Behavioral experiments were conducted in a sound-attenuated and air-regulated room, where the animals were habituated 1 hour prior to experiments. All possible means were applied to minimize animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilize alternatives to *in vivo* techniques. All animal experimentations reported in this study were performed under established standards of the Brazilian law No. 11.794/2008, in accordance with the ARRIVE guidelines for animal experimentation (Kilkenny et al., 2010), the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research.

### 2.2. Drugs and treatments

N-[3-aminopropyl]-1,4-butanediamine trihydrochloride (spermidine), DL- $\alpha$ -difluoromethylornithine hydrochloride (DFMO), N-methyl D-aspartate (NMDA), A $\beta_{25-35}$  and A $\beta_{35-25}$  were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); 1,4-diguanidinobutane sulfate (aracaine) was obtained from Pfaltz & Bauer (Waterbury, CT, USA); CP-101,606 (Traxoprodil) was kindly donated by Pfizer Inc. (New Your, NY, USA); Bicuculline, 4-aminopyridine (4-AP)



and MK-801 were purchased from Tocris. For behavioral experiments, traxoprodil, DFMO, arcaine and spermidine were dissolved in 50 mM phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4. For *in vitro* experiments spermidine, traxoprodil, arcaine and DFMO were dissolved in DMSO (final concentration of 0.001%).

$A\beta_{25-35}$  and  $A\beta_{35-25}$  were dissolved in saline at a concentration of 3 mM and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aggregation of  $A\beta_{25-35}$  was performed following protocol described elsewhere (Maurice et al., 1996). Briefly,  $A\beta_{25-35}$  and  $A\beta_{35-25}$  peptide were dissolved in sterile bidistilled water at a concentration of 3 mM and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .  $A\beta_{25-35}$  and its inverted sequence were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 4 days in order to induce aggregation. In all behavioral experiments,  $A\beta_{25-35}$ ,  $A\beta_{35-25}$ , spermidine, traxoprodil, arcaine and DFMO, were administered through intracerebroventricular (i.c.v.) route, according to Dalmolin and coworkers (2011). Briefly, mice were anesthetized with isoflurane until full anesthesia was achieved. The microinjections were performed using a Hamilton 10 $\mu\text{l}$  syringe connected to a specially made 28-gauge stainless steel needle with 3 mm in length. The needle was inserted directly through the skin and skull into the lateral ventricle, targeted by visualizing an equilateral triangle between the eyes and center of skull to locate bregma, then inserting the needle 1 mm laterally to this point. This avoids the use of unnecessary force since the needle penetrates at the suture line of the skull plates. Compounds were injected in a volume of 3 $\mu\text{l}$  over a 5 sec period, followed by a 10 sec delay to allow diffusion and prevent backflow. All injections were performed by an experimenter well trained in this technique. When co-administered (spermidine and arcaine, Figure 2), drugs were injected using a polyethylene tube attached to the Hamilton syringe. A bubble of 1 cm kept the drugs apart and an interval of approximately 30 seconds separated each drug injection.

### 2.3. Novel Object Recognition Task

Novel object recognition task was performed in a 30 x 30 x 30 cm wooden chamber with walls painted black, the front wall made of Plexiglas and the floor covered with ethyl vinyl acetate sheet. A light bulb, hanging 60 cm above the behavioral apparatus, provided constant illumination of about 40 lux, and an air-conditioner provided constant background sound isolation. The objects used were plastic mounting bricks, each of them with different shapes and colors, but same size. Throughout the experiments objects were used in a counterbalanced manner and animals showed no preference for any of the objects. Chambers and objects were thoroughly cleaned with 30% ethanol before and after each animal was test.

Six days after  $A\beta_{25-35}$  or  $A\beta_{35-25}$  injection, novel object recognition task was performed according to Wang and coworkers (2007), with minor modifications. The task consisted of habituation, training and testing sessions, each of them lasting 8 minutes. In the first session, mice were habituated to the behavioral apparatus, with no objects, and then returned to their home cages. Twenty-four hours later, training session took place, where animals were exposed to two equal objects (object A), and the exploration time was recorded with two stopwatches. Exploration was recorded when the animal touched or reached the object with the nose at a distance of less than 2 cm. Climbing or sitting on the object was not considered exploration. Immediately after training the animals received the following treatments: vehicle, traxoprodil (0.002 – 0.2 nmol/site), arcaïne (0.02 – 0.2 nmol/site) or spermidine (2 nmol/site). DFMO (0.27 – 27 nmol/site) was given 1 hour prior training. Doses used were based in previous work (Rubin et al., 2004; Gomes et al., 2010; Silva et al., 2011) and dose-effect curves (Figure 1B, 1D, 1E). Figure 1A, Figure 2A and Figure 2B display a time-line with treatments and administration time. The test session was carried out 24 hours after training, when mice were placed back in the behavioral chamber and one of the familiar objects (i.e.

object A) was replaced by a novel object (i.e. object B). 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,  $\left(\frac{T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}}}{T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}}}\right) \times 100$  (%), and used as a memory parameter. Experiments and data analysis were conducted by an experimenter blind to treatment conditions.

#### 2.4. Extrasynaptic NMDAR-induced jacob nuclear accumulation

In order to assess extrasynaptic NMDAR activation and subsequent jacob protein accumulation in the nucleus, assays were performed according to Behnisch and coworkers (2011). This protocol is shown to effectively induce non-phosphorylated jacob accumulation in the nucleus, with concomitant reduction of jacob levels at the dendritic shaft (Karpova et al., 2013). Hippocampal neurons (21 DIV) were successively incubated with 50  $\mu\text{M}$  bicuculline, 2.5 mM 4-AP and 10  $\mu\text{M}$  MK-801 for irreversible blocking of activated synaptic NMDAR. After 30 minutes of incubation, cells were washed with conditioned NB medium and then 200  $\mu\text{M}$  NMDA, (applied for 3 minutes, followed by a wash out), or spermidine (400  $\mu\text{M}$ ),  $\text{A}\beta_{25-35}$  (10  $\mu\text{M}$ ), traxoprodil (4 nM), arcaine (4  $\mu\text{M}$ ), DFMO (5  $\mu\text{M}$ ) or the combination of  $\text{A}\beta_{25-35}$  + traxoprodil,  $\text{A}\beta_{25-35}$  + arcaine,  $\text{A}\beta_{25-35}$  + DFMO were applied for 30 minutes prior fixation. Anisomycin-containing medium (7.5  $\mu\text{M}$ ) was used throughout the experiments.

Primary antibodies were diluted in blocking buffer (rabbit anti-pan-Jacob 1:350, mouse anti-MAP-2 1:500 (Sigma) and incubated overnight at 4°C. After washing with PBS, coverslips were incubated with DAPI (1:1000, 10 min) in PBS and mounted on slides with Mowiol.

## 2.5. Primary cell culture and analysis of dendritic spines morphology

Hippocampal primary cultures were prepared as described previously (Dieterich et al., 2008) using 19 days old Wistar rat embryos (Leibniz Institute for Neurobiology, breeding stock). Cells were plated in a density of 40.000 cells per 18 mm coverslips, grown in 1 ml of neurobasal medium (NB, Gibco) supplemented with B27 (Life Technologies) and 200 mM L-glutamine. Cells were kept in a humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C with no further change. In order to perform analysis of dendritic spines morphology, hippocampal neuron cultures were transfected with eGFP expressing plasmid at 7/9 DIV using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) (Kapitein et al., 2011). Briefly, 1.8 µg of eGFP-N1 plasmid (Clontech, Mountain View, CA) was mixed with 3 µl Lipofectamine 2000 in 200 µl of NB, incubated for 30 min, added to the neurons and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for additional 60 min. Next, NB medium containing transfection mix was exchanged with conditioned NB and kept for additional 2 weeks at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

At DIV 21, cells were incubated with A $\beta$ <sub>25-35</sub> (10 µM) for 24 hours. Two hours prior to 4% (w/v) paraformaldehyde fixation, traxoprodil (4 nM), arcaïne (4 µM) or DFMO (5 µM) were mixed in the culture media. GFP expressing cultured neurons were washed, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 minutes washed with PBS and mounted on the slides with Mowiol. Drug concentration and application duration were chosen based on previous work (Yatin et al., 1997; Yatin et al., 2001).

## 2.6. Confocal laser scan microscopy

Images were acquired using a confocal microscope (Leica TCS-SP5-II. Leica-Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with Plan Apo 63x oil NA 1.4 objective and a

Diode (405 nm), Argon (458, 476, 488, 496, 514 nm laser lines), Diode Pumped Solid State (DPSS, 561 nm) and HeNe (633 nm) lasers. Laser intensity and signal detection settings were held constant to allow quantitative comparison between experimental groups. Cells were scanned with optical serial sections of 0.29  $\mu\text{m}$  intervals and, depending on the experiment, maximum intensity or mean average projection of z-stack images from individual cell nuclei and dendritic branches were generated (ImageJ software, NIH, Bethesda, USA).

For dendritic spines density and morphology experiments, one to three dendritic segments (20  $\mu\text{m}$ ), distal and proximal from soma of each neuron were used, and analysis was performed using NeuronStudio software 0.9.92 (Rodriguez et al., 2008; Computation Neurobiology and Imaging Center, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA). Spines were defined as protrusions that could be differentiated from the dendritic shaft and restricted to those that were visible in the x- and y-axes.

Quantification of jacob nuclear accumulation was performed as previously described (Dieterich et al., 2008). Briefly, images were open on Image J software and the nuclear region of interest (ROI) was defined using the threshold from the DAPI staining. Nuclear jacob immunoreactivity was measured as mean grey values (arbitrary units in pixel intensity). Data plotted in the graphs were normalized relative to control group.

## 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 5.01. Values are given as mean  $\pm$  S.E.M. One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) test, depending on the experiment. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Blockade of polyamine binding site at NMDAR or inhibition of polyamine synthesis reverses $A\beta_{25-35}$ -induced memory impairment

In order to test whether modulation of the polyamine counteract memory impairment induced by  $A\beta$  injection, mice injected with  $A\beta_{25-35}$ , or its inverted sequence were treated with traxoprodil, a GluN2B antagonist of NMDAR, arcaine, an antagonist of the polyamine binding site at NMDAR, or DFMO, a polyamine synthesis inhibitor. We found no significant difference in the amount of time that animals of all groups spent exploring both objects in the training session, indicating no biased exploration of the objects (data not shown). However, during the test session,  $A\beta_{25-35}$ -injected mice performed worse than controls in the novel object recognition task, as shown by a decrease in the discrimination index when compared to control ( $P < 0.05$ , Fig. 1C, 1E, 1G).

Administration of traxoprodil (0.02 nmol/site) in naive mice significantly reduced the discrimination index for the novel object when compared to control (One-way ANOVA,  $F_{(3,15)} = 6.736$ ,  $P < 0.01$  Fig. 1B). Administration of a dose of traxoprodil that had no effect in control mice (0.002 nmol/site) restored memory of  $A\beta_{25-35}$ -injected mice, as indicated by a higher discrimination index when compared to the vehicle treated- $A\beta_{25-35}$ -injected group in the test session (Two-way ANOVA,  $F_{(1,16)} = 6.303$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 1C).

Administration of arcaine (0.2 nmol/site) in naive mice significantly reduced the discrimination index for the novel object when compared to control (One-way ANOVA,  $F_{(2,6)} = 6.705$ ,  $P < 0.05$  Fig. 1D). Administration of a dose that had no effect *per se* (0.02 nmol/site), restored memory in  $A\beta_{25-35}$  - injected mice, with a higher discrimination index when compared to the saline treated -  $A\beta_{25-35}$  -injected group in the test session (two-way

ANOVA,  $F_{(1,16)}=18.91$ ,  $P<0.001$ , Fig. 1E), suggesting that the polyamine binding site at NMDAR plays a role in the cognitive deficits induced by  $A\beta_{25-35}$ .

We next administered the ODC enzyme inhibitor DFMO in order to verify whether blockade of enzymatic activity, and thereby blockade of polyamine synthesis, could rescue memory deficits of mice injected with  $A\beta_{25-35}$ . DFMO (27 nmol/site) injected 1 hour prior training significantly reduced the discrimination index, compared to control mice treated with saline (one-way ANOVA,  $F_{(3,8)}=4.44$ ,  $P<0.05$  Fig. 1F). The administration of DFMO, at a dose that had no effect in control mice (2.7 nmol/site), restored memory of animals injected with  $A\beta_{25-35}$  (Two-way ANOVA,  $F_{(1,25)}=24.44$ ,  $P<0.001$ , Fig 1G).

Since both arcaine and DFMO rescued memory deficits in mice injected with  $A\beta_{25-35}$ , the next set of experiments was designed to assess whether the co-administration of spermidine could reestablish the memory impairment induced by  $A\beta_{25-35}$  injection, after it had been reversed by arcaine or DFMO. Spermidine (2 nmol/site), administered immediately after training in arcaine-treated animals, significantly reduced the discrimination index (Two-way ANOVA,  $F_{(1,22)}=72.09$ ,  $P<0.0001$ , Fig. 2B). In a second experiment, mice injected with  $A\beta_{25-35}$  received DFMO 1 hour prior to training and then immediately after training spermidine was administered. This protocol reversed the ameliorative effect of DFMO on memory of mice injected with  $A\beta_{25-35}$  (Two-way ANOVA,  $F_{(1,23)}=69.39$ ,  $P<0.0001$ , Fig.2B). This data suggest that spermidine levels can influence whether learning is acquired or not by  $A\beta_{25-35}$ -injected mice.

### 3.2. Blockade of the polyamine binding site at NMDARs or inhibition of polyamine synthesis abolish A $\beta$ <sub>25-35</sub>-induced jacob nuclear accumulation

Extrasynaptic NMDAR activation has been shown to mediate nuclear translocation of jacob protein, which is followed by dephosphorylation of CREB stripping of synaptic contacts, a simplification neuronal cytoarchitecture and eventually leads to cell death (Dieterich et al., 2008). Previous studies suggest that application of A $\beta$ <sub>1-42</sub> drives Jacob into the nucleus and that this phenomenon correlates with activation of extrasynaptic GluN2B containing NMDARs (Rönicke et al., 2011). Taken together, extrasynaptic Jacob pathway might be involved in the A $\beta$ -induced memory impairment. To test whether negative modulation of polyamine system blocks jacob nuclear accumulation induced by A $\beta$ <sub>25-35</sub>, hippocampal neurons in culture were stimulated according to a previously published protocol (Behnisch et al., 2008) and the jacob nuclear accumulation was determined by immunocytochemistry.

Bath application of 200  $\mu$ M NMDA for 3 min resulted in increased Jacob nuclear immunofluorescence levels (Fig. 3A, 3E). Incubation of cells with spermidine (400  $\mu$ M) alone also induced nuclear translocation of jacob (One-way ANOVA,  $F_{(2,40)}=16.05$ ;  $p<0.0001$ , Fig. 3A, 3E). Furthermore, incubation of primary hippocampal neurons with A $\beta$ <sub>25-35</sub> (10  $\mu$ M) also led to increased nuclear Jacob immunofluorescence (Fig. 3B, 3C, 3D, 3F, 3G, 3H). The co-administration of traxoprodil (4 nM) (Two-way ANOVA,  $F_{(1,83)}=13.52$ ,  $p=0.0004$ , Fig. 3B, 3F) or arcaine (4  $\mu$ M) (Two-way ANOVA,  $F_{(1,65)}=10.24$ ,  $p=0.002$ , Fig. 3C, 3G) significantly blocked the A $\beta$ -induced increase of Jacob nuclear immunofluorescence. Moreover, incubation of cells with DFMO (5  $\mu$ M) for 10 min prior to A $\beta$  application, significantly reduced the translocation of Jacob to the nucleus (Two-way ANOVA,  $F_{(1,75)}=8.262$ ,  $p=0.0052$ ), Fig. 3D, 3H). These results suggest that the polyamine binding site at extrasynaptic NMDAR



might be involved in the cascade of events that lead to the A $\beta_{25-35}$  induced nuclear import of Jacob.

### 3.3. Blockade of the polyamine binding site at NMDAR and inhibition of polyamine synthesis reduce A $\beta_{25-35}$ -induced changes in spine number and morphology

Since one of the outcomes of extrasynaptic NMDAR activation is the reduction of synaptic contacts (Dieterich et al., 2008), We next asked whether the observed effects of traxoprodil, arcaine or DFMO on nuclear import of Jacob were correlated with changes in spine number and morphology. Incubation of hippocampal neurons for twenty-four hours with A $\beta_{25-35}$  (10  $\mu$ M) significantly decreased the number of dendritic spines ( $P < 0.05$ , Fig. 4A, Fig. 4B, 4D, 4F) and markedly reduced the number of mushroom-like spines and induced a relative increase in stubby-like spines ( $P < 0.05$ , Fig. 4C, 4E, 4G). Incubation of primary hippocampal neurons with traxoprodil (4nM) for two-hours significantly rescued the decrease of spine number induced by A $\beta_{25-35}$  (Two-way ANOVA,  $F_{(1,143)}=9.220$ ,  $p=0.0028$ , Fig. 4B). Traxoprodil also rescued the A $\beta_{25-35}$ -induced changes in dendritic spine morphology with an increased number of mushroom-like spines and a reduction in stubby-like spines (Two-way ANOVA,  $F_{(3,139)}=9.634$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 4C).

Blockade of the polyamine binding site at NMDAR by arcaine also attenuated the effect of A $\beta_{25-35}$  application on dendritic spine morphology and number. Application of arcaine for two hours significantly blocked the A $\beta$ -induced reduction spine number (Two-way ANOVA,  $F_{(1,115)}=54.22$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 4D) and increased the number of mushroom like spines and reduced stubby like spines in cultures incubated with A $\beta_{25-35}$ , (Two-way ANOVA,  $F_{(3,116)}=29.12$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 4E). Furthermore, inhibition of ODC by DFMO also rescued

spine number (Two-way ANOVA,  $F_{(1,123)}=18.15$ ,  $p<0.0001$ , Fig. 4F) and morphology (Two-way ANOVA,  $F_{(3,126)}=74.6$ ,  $p<0.0001$ , Fig. 4G) of neurons incubated with  $A\beta_{25-35}$ .

#### 4. Discussion

Although changes in polyamine system were reported both in AD and AD-like conditions (Choi et al., 2001; Mäkitie et al., 2010; Morrison and Kish, 1995; Morrison et al., 1998; Paik et al., 2006; Yatin et al., 1997; Yatin et al., 2001), it remained to be addressed whether modulation of this system could counteract the cognitive impairment present in such conditions. Using behavioral and cell imaging approaches, we showed that negative modulation of polyamine system counteracts the deleterious effect of  $A\beta_{25-35}$  on memory of mice tested in the novel object recognition task. Moreover, blockade of polyamine binding site at NMDARs reversed the  $A\beta$ -induced increase in protein jacob nuclear accumulation, a marker of extrasynaptic NMDAR activation, that leads to synaptic stripping and reduction of dendritic spines. Negative modulation of polyamine system also reversed the reduction in dendritic spine number and changes in dendritic spine morphology induced by  $A\beta$ .

Polyamines, like spermidine and spermine, are positive modulators of NMDAR. Its binding site resides in the dimer interface formed by the lower lobes of GluN1/GluN2B N-terminal domains. This GluN1/GluN2B dimer can be found in two different states, a desensitized-like state and an active state. Binding of polyamines stabilize the dimer in the active state, thus favoring agonist binding (Kew and Kemp, 1998; Mony et al., 2011). It is interesting to note that, in physiological conditions, polyamines enhance memory of rodents in different learning paradigms (Gomes et al., 2010; Rubin et al., 2004; Velloso et al., 2009). Conversely, here we demonstrated that negative modulation of polyamine system reverses the memory impairment of  $A\beta_{25-35}$ -injected mice, an established model of AD-like cognitive

deficit (Kaminsky et al., 2010). Both traxoprodil and arcaine, antagonist of the GluN2B NMDAR subunit and the polyamine binding site at NMDAR, rescued memory of A $\beta$ -injected mice in the novel object recognition task. It is worth pointing out that polyamine levels were found increased in the temporal cortex of AD patients (Morrison and Kish, 1995), a brain area that is involved in processing of episodic memory, one of the first cognitive function impaired in AD (Dickerson and Einchenbaum, 2010). We also found that the administration of spermidine, in arcaine- or DFMO-treated A $\beta_{25-35}$ -injected animals (Figure 2) restored the A $\beta$ -induced memory impairment, suggesting that a polyaminergic tonus might dictate whether learning is acquired or not in these animals.

The polyaminergic tonus is tightly regulated by ODC activity. Inhibition ODC enzyme, through DFMO administration, reversed memory impairment of A $\beta_{25-35}$ -injected mice. This enzyme, which is the rate-limiting enzyme in the polyamine pathway, is finely tuned by both polyamine levels and antizyme activity. Antizyme is a regulatory protein that binds to ODC and forms an inactive complex (Coffino, 2001). Mäkitie and coworkers (2010) reported increased immunoreactivity of antizyme inhibitor (AZIN) in the hippocampus of AD patients, which may explain the increased ODC activity levels found in brain of AD patients (Morrison and Kish, 1998). Indeed, AZIN and NMDA receptors were found to be co-localized in hippocampal neurons (Mäkitie et al., 2010), suggesting that AZIN regulates glutamatergic signaling, possibly by controlling local production of polyamines.

We used an A $\beta_{25-35}$ -injection protocol as a mean to induce AD-like cognitive impairment. It is worth pointing out that the A $\beta$  aggregation protocol used in this work yields almost exclusively oligomers of A $\beta_{25-35}$  (Zussy et al., 2013), which represents the biologically active region of the full length A $\beta$  peptide (Pike et al., 1995), and can induce cell death, synaptic loss and memory impairment (Yamada and Nabeshima, 2000; Zussy et al., 2013). It has been shown that the cognitive and synaptic plasticity impairment induced by A $\beta$  peptide relies on NMDAR activation (Kamenetz et al., 2003; Lo and Grossberg, 2011; Shankar et al., 2007). The location of this receptor might account for the toxic effects of its activation, once

different compartmentalized signaling cascades are activated after synaptic or extrasynaptic NMDARs stimulation (Hardingham and Bading, 2010). Activation of extrasynaptic NMDARs leads to translocation of jacob to the nucleus, which is followed by reduction in dendritic spine number and simplification of dendritic tree (Dieterich et al., 2008; Karpova et al., 2013).  $A\beta_{1-42}$  oligomers induce jacob nuclear accumulation, an effect blocked by ifenprodil, an antagonist of the GLuN2B subunit of NMDARs (Rönicke et al., 2011). Likewise, here we reported increased jacob nuclear immunoreactivity upon spermidine or  $A\beta_{25-35}$  application in hippocampal neuron cultures, an effect abolished upon negative modulation of polyamine system. Thus, it is feasible that the memory rescuing effect in  $A\beta$ -injected mice might be related to the blockade of polyamine binding sites in NMDAR located at extrasynaptic sites. However, we cannot exclude other mechanisms, since it has been shown that endogenous polyamines can promote aggregation of  $A\beta$ -peptide into more toxic forms, from monomers to fibrils (Luo et al., 2013).

Changes in dendritic spine morphology are correlated with cognitive function. In AD, the reduction in synapses and dendritic spine number is strongly correlated with cognitive decline (DeKosky and Scheff, 1990; Walsh and Selkoe, 2004). Moreover, changes in dendritic spine morphology are also coordinated with synaptic function, whereas spine enlargement parallels long-term potentiation, and spine shrinkage is associated with long-term depression (Kasai et al., 2010). Thus, both spine loss and spine morphology changes may affect memory of  $A\beta_{25-35}$ -injected mice. The incubation of hippocampal neurons cultures with  $A\beta_{25-35}$  significantly reduced dendritic spine number and induced a reduction in mature spines (mushroom spines) and an increase in non-functional spines (stubby spines). Negative modulation of polyamine system, either by blockade of polyamine binding site at NMDARs or inhibition of polyamine synthesis counteracted the deleterious effects of  $A\beta_{25-35}$  on dendritic spine number and morphology. Therefore, polyamines, through its action on NMDARs located at extrasynaptic sites could be involved in the loss of synaptic contacts and simplification of neuronal morphology that ultimately would lead to memory impairment.

#### 4.1. Concluding remarks

Alterations in polyamine system have been associated with Parkinson's disease (Lewandowski et al., 2010), schizophrenia (Fiori and Turecki, 2008) and major depression disorder (Chen et al., 2010), all neurological diseases which have been shown to display NMDARs activity dysfunction. Here, we have demonstrated that modulation of polyamine system counteracts the cognitive deficits induced by injection of  $A\beta_{25-35}$  in mice. Interesting, once established, both the memory impairment and the alterations in the neuronal morphology induced by  $A\beta_{25-35}$  were properly reversed by blockade of polyamine binding site at the NMDAR, possibly located at extrasynaptic sites, suggesting that modulation of this system might represent an interesting target for drug intervention.

#### Acknowledgments

This study was supported by CNPq (306164/2010-8, 481664/2010-6, 476551/2009-9). C.F. Mello and M.A. Rubin are recipients of CNPq fellowships. Gomes GM is recipient of DAAD/CAPES cooperation program fellowship. MRK is supported by the DFG (SFB 779 TP B8), DIP grant, and the German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Location Magdeburg, Germany. AK is supported by the federal state of Saxony-Anhalt, Vorhaben: Center for Behavioral Brain Sciences (CBBS). The authors thank Rinaldo da Rosa Moreira, Corinna Borutzki, Stefanie Hochmuth and Monika Marunde for technical support.

**References**

Behnisch T, YuanXiang P, Bethge P, Parvez S, Chen Y, Yu J et al. 2011. Nuclear translocation of Jacob in hippocampal neurons after stimuli inducing long-term potentiation but not long-term depression. *PLoS ONE* 2011;6(2): e17276.

Chen GG, Fiori LM, Moquin L, Gratton A, Mamer O, Mechawar N et al. 2010. Evidence of altered polyamine concentrations in cerebral cortex of suicide completers. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(7): 1477 – 84.

Choi MH, Kim KR, Kim IS, Lho DS, Chung BC 2001. Increased hair polyamine levels in patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* ;50: 128.

Coffino P, 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Mol. Cell. Biol.* 2: 188 – 94.

Dalmolin GD, Silva CR, Rigo FK, Gomes GM, Cordeiro Mdo N, Richardson M et al. 2011. Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. *Pain* 152(10):2224-32.

DeKosky ST and Scheff SW, 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 27: 457-64.

Dickerson BC and Eichenbaum H, 2010. The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology* 35: 86-104.

Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, König I, Landwehr M et al. 2008. Calbindin-D28k: A protein liaison that couples NMDA receptor signaling to the nucleus. *PLOS Biol.* 2008;6(2): 286-306.

Ferreira ST and Klein WL, 2012. The A $\beta$  oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96: 529 – 43.

Fiori LM and Turecki G, 2008. Implication of the polyamine system in mental disorders. *J. Psychiatry Neurosci.* 33(2): 102 – 10.

Gomes GM, Mello CF, da Rosa MM, Bochi GV, Ferreira J, Barron S et al. 2010. Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93(4): 589-95.

Gruden MA, Davidova TB, Malisauskas M, Sewell RD, Voskresenskaya NI, et al., 2007. Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: Autoantibodies to Ab(25-35) oligomers, S100B and neurotransmitters. *J. Neuroimmunol.* 186: 181 – 92.

Hardingham GE and Bading H, 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signaling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11: 682-96.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T et al. 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37: 925-37.

Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA, 2010. Subcellular and metabolism examination of amyloid- $\beta$  peptides in Alzheimer disease pathogenesis: Evidence for A $\beta$ <sub>25-35</sub>. *Exp. Neurol.* 221: 26-37.

Kapitein LC, Yau KW, Gouveia SM, van der Zwan WA, Wulf PS, Keijzer N et al. 2011. NMDA receptor activation suppresses microtubule growth and spine entry. *J. Neurosci.* 1;31(22): 8194 – 209.

Karpova A, Mikhaylova M, Bera S, Bär J, Reddy PP, Behnisch T et al. 2013. Encoding and transducing the synaptic or extrasynaptic origin of NMDA receptor signals to the nucleus. *Cell.* 28;152(5): 1119-33.

Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33: 121-29.

Kew JN and Kemp JA 1998. An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurons. *J. Physiol.* 412(1): 17-28.

Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting guidelines working group, 2010. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160(7):1577-9.

Kubo T, Nishimura S, Kumagae Y, Kaneko I, 2002. In vivo conversion of racemized b-amyloid ([D-Ser 26]Ab 1–40) to truncated and toxic fragments ([DSer 26] Ab 25–35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J. Neurosci. Res.* 70: 474–483.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *P Natl Acad Sci USA*, 95, 6448 – 53.

Léger M, Dulude D, Steinberg SV, Brakier-Gingras L, 2007. The three transfer RNAs occupying the A, P and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res*, 35(16):5581-92.

Lewandowski NM, Ju S, Verbitsky M, Ross B, Geddie ML, Rockenstein E, et al. 2010. Polyamine pathway contributes to the pathogenesis of Parkinson disease. *P. Natl. Acad. Sci.* 28;107(39): 16970 – 75.

Lo D and Grossberg GT, 2011. Use of memantine for the treatment of dementia. *Expert Rev. Neurother.* 11(10): 1359-70.

Luo J, Yu CH, Yu H, Borstnar R, Karmelin SC, Gräslund A et al. 2013. Cellular polyamines promote amyloid-beta ( $\alpha\beta$ ) peptide fibrillation and modulate the aggregation pathways. *ACS Chem. Neurosci.* 20;4(3): 454-62.

Mäkitie LT, Kanerva K, Polvikoski T, Paetau A, Andersson LC, 2010. Brain neurons express ornithine decarboxylase-activating antizyme inhibitor 2 with accumulation in Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.* 20(3):571-80.



Maurice T, Lockhart BP, Privat A, 1996. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* 706: 181–93.

Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P, 2011. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO Journal* 30: 3134-6.

Morrison LD and Kish SJ, 1995. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 197: 5-8.

Morrison LD, Cao XC, Kish SJ, 1998. Ornithine decarboxylase in human brain: influence of aging, regional distribution, and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 71: 288-94.

Olivares D, Deshpande VK, Shi Y, Lahiri DK, Greig NH, Rogers JT et al. 2012. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 9(6): 746-58.

Paik MJ, Lee S, Cho KH, Kim KR, 2006. Urinary polyamines and N-acetylated polyamines in four patients with Alzheimer's disease as their N-ethoxycarbonyl-N-pentafluoropropionyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Anal. Chim. Acta.* 576: 55-60.

Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, et al. 1995. Structure-activity analyses of b-amyloid peptides: Contributions of the  $\beta$ 25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* 64: 253–265.

Prince M and Jackson J, 2009. *World Alzheimer's Report*. London. Alzheimer's Disease International. 2009.

Roberson ED and Mucke L, 2006. 100 years and counting: Prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* 3;314(5800): 781-4.

Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL, 2008. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. PLoS ONE 3(4):e1997.

Rönicke R, Mikhaylova M, Rönicke S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M et al. 2011. Early neuronal dysfunction by amyloid  $\beta$  oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. Neurobiol. Aging 32(12): 2219-28.

Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeir JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TL et al. 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulate fear conditioning in rats. J. Neurosci. 3;24(9): 2328-34.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL, 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloide-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. J. Neurosci. 27: 2866-75.

Silva MA, Klafke JZ, Rossato MF, Gewehr C, Guerra GP, Rubin MA et al. 2011. Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain. Biochem. Pharmacol. 1;82(3): 269-77.

Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S et al. 2013. A $\beta$  induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2;110(27): E2518-27.

Tekirian TL, 2001. A $\beta$  N-terminal isoforms: Critical contributors in the course of Alzheimer's disease pathophysiology. J. Alzheimers Dis. 3: 241 – 48.

Velloso NA, Dalmolin GD, Gomes GM, Rubin MA, Canas PM, Cunha RA et al. 2009. Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. Neurobiol. Learn. Mem. 92(4) 574-80.

Walsh DM and Selkoe DJ, 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44: 181-93.

Wang D, Noda Y, Zhou Y, Mouri A, Mizoguchi H, Nitta A et al. 2007. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid<sub>25-35</sub> i.c.v.-injected mice: Involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology* 32: 1261-71.

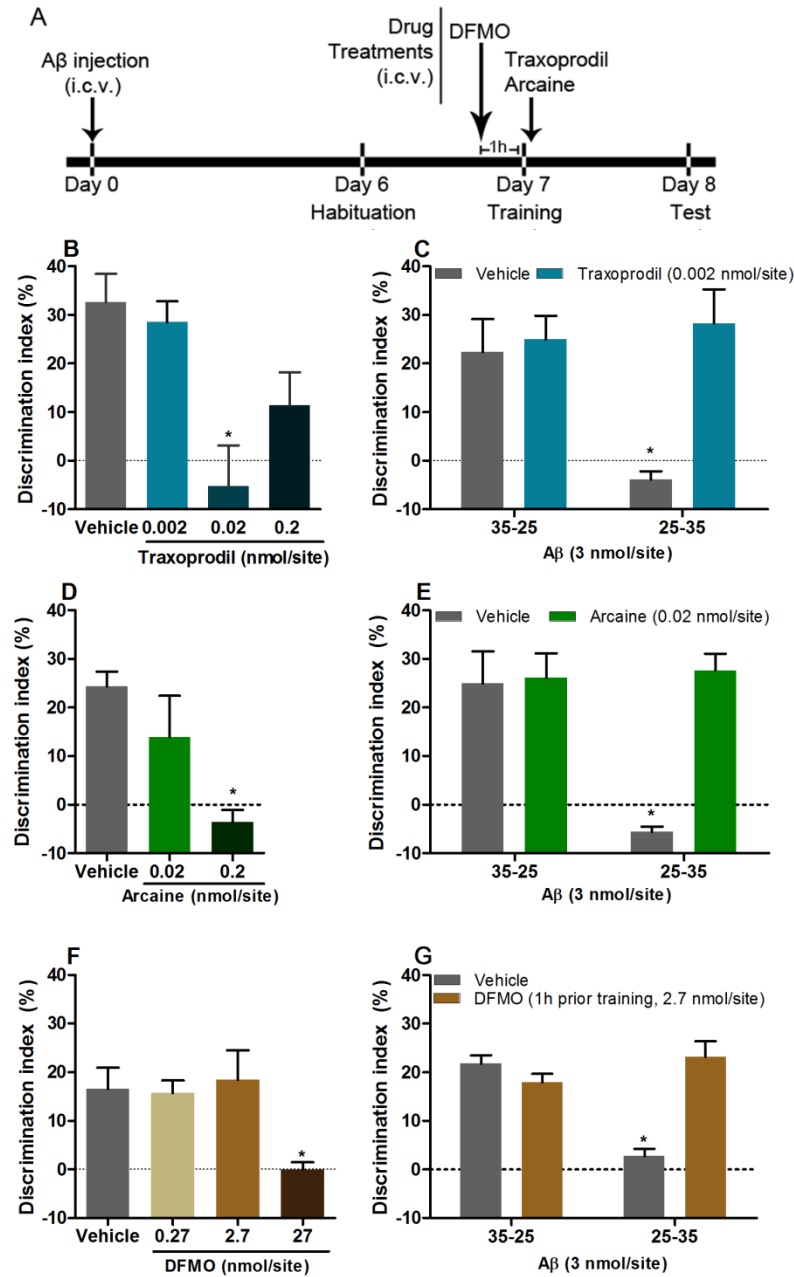
Yamada K, Nabeshima T, 2000. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol. Ther.* 88: 93-113.

Yatin SM, Yatin M, Aulick T, Ain KB, Butterfield DA, 1997. Alzheimer's amyloid beta-peptide associated free radicals increase rat embryonic neuronal polyamine uptake and ornithine decarboxylase activity: protective effect of vitamin E. *Neurosci. Lett.* 263: 17-20.

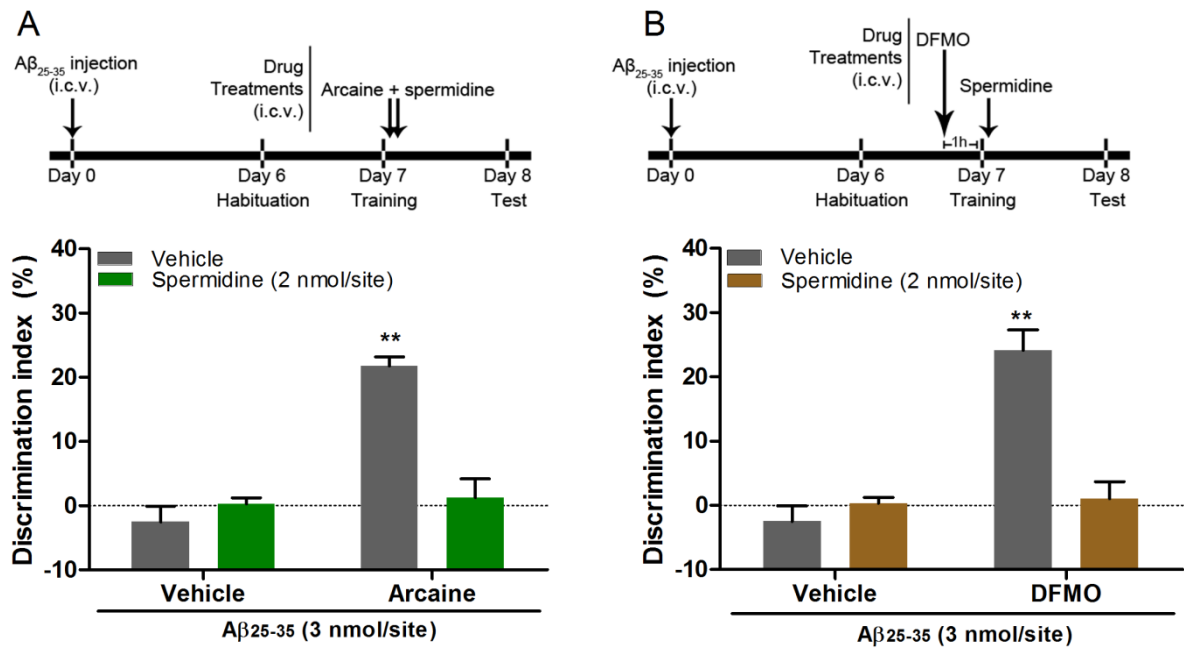
Yatin SM, Yatin M, Varadarajan S, Ain KB, Butterfield DA, 2001. Role of spermine in amyloid beta-peptide-associated free radical-induced neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 63: 395-401.

Zussy C, Brureau A, Keller E, Marchal S, Blayo C, Delair B, et al. 2013. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- $\beta$  peptide injection in rats. *PLOS One* 2013; 8(1): e53117.

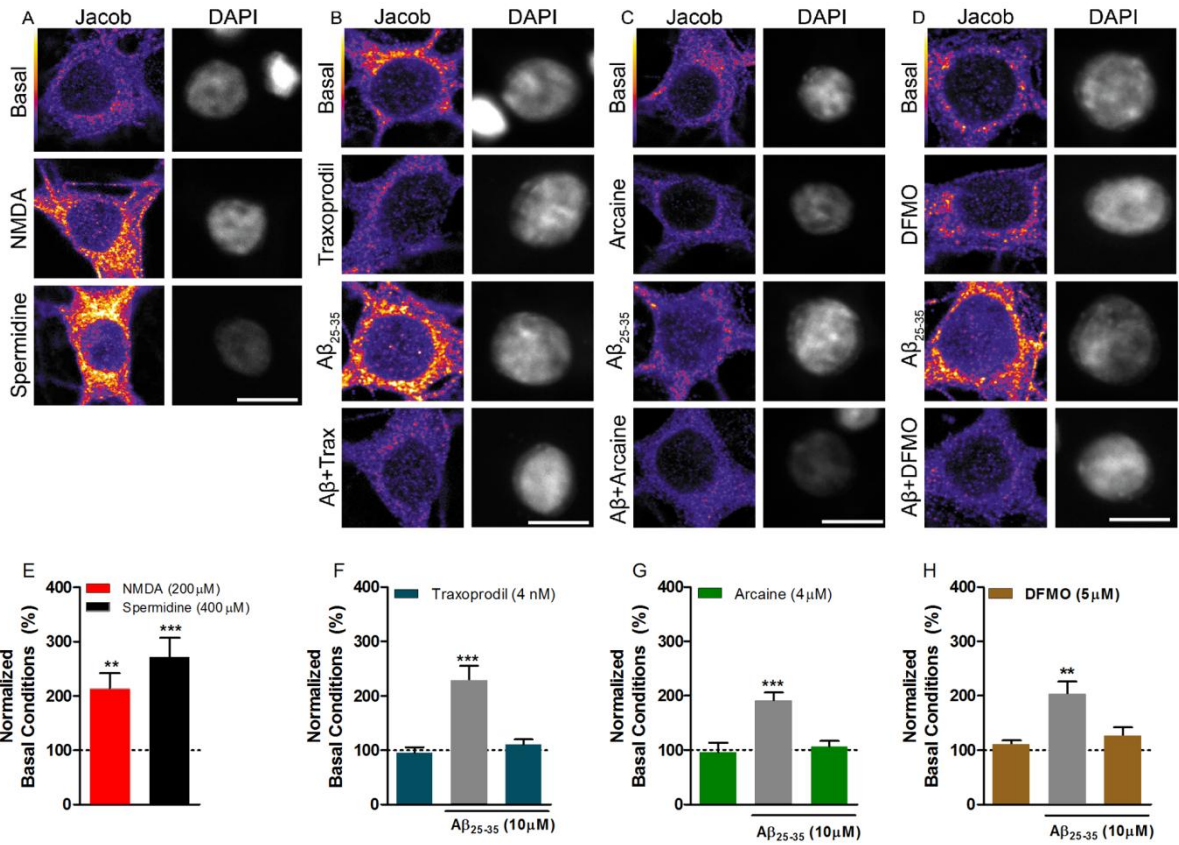
Figures and Legends



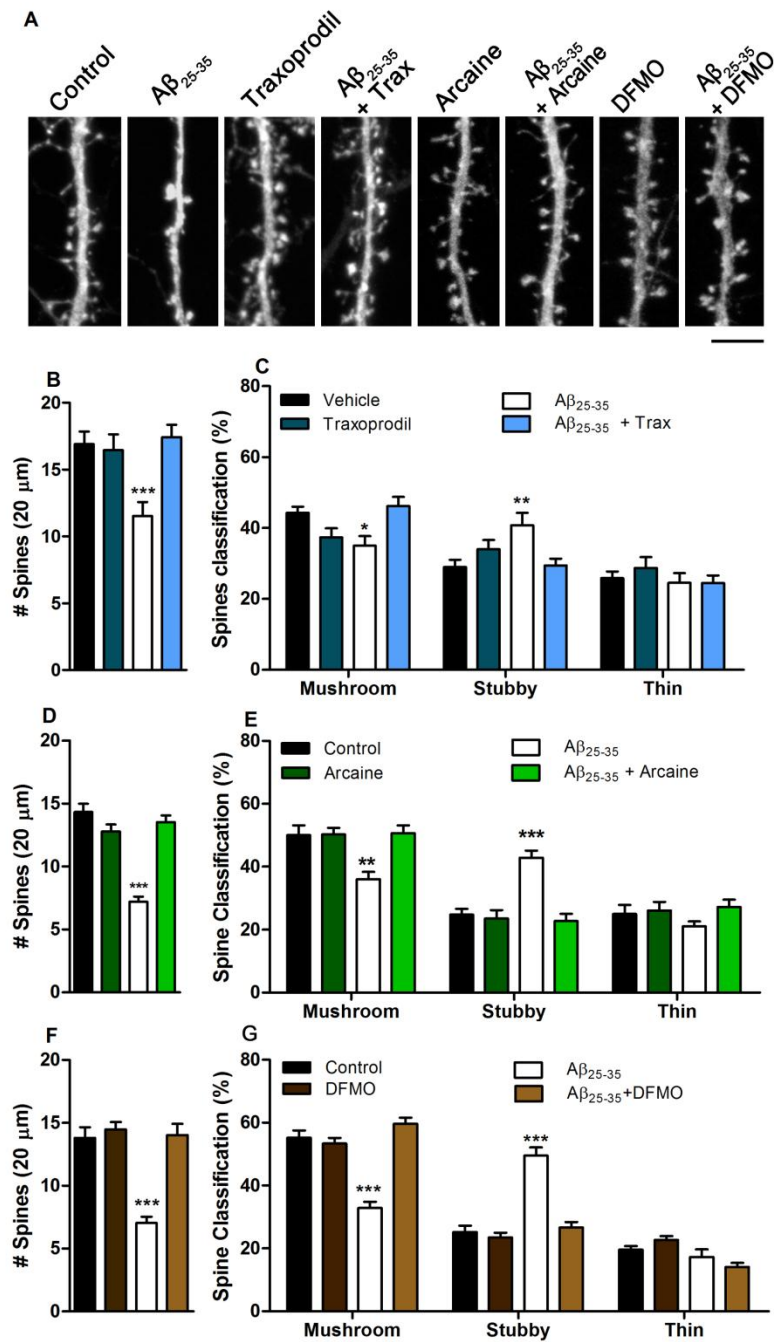
**Figure 1:** Traxoprodil (B, C), arcaine (D, E) and DFMO (F, G) restore memory of Aβ<sub>25-35</sub>-injected mice, in the novel object recognition task. (A) Experimental schedule, i.c.v., intracerebroventricular. Traxoprodil and arcaine were administered immediately after training. DFMO was administered 1 hour prior training. Data shown as mean + S.E.M. N=3 - 5 animals per group for B, D, F. N=5 - 9 animals per group for C, E, G. \*P<0.05 when compared to control.



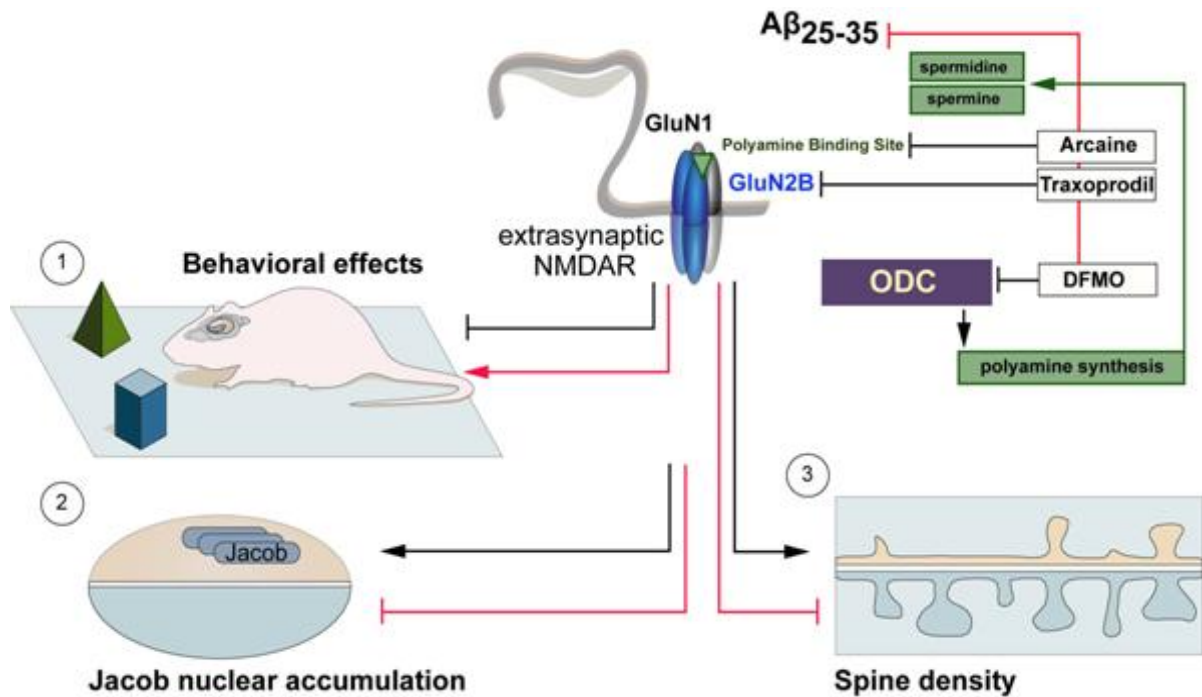
**Figure 2:** Spermidine administration reverses the ameliorative effects of arcaine and DFMO on memory of Aβ<sub>25-35</sub>-injected mice. (A) Spermidine was co-administered with arcaine (0.02 nmol/site) immediately after training. (B) (2.7 nmol/site) DFMO was administered 1 hour prior training and immediately after training were injected with spermidine. I.c.v., intracerebroventricular. Data shown as mean + S.E.M. N=6 - 7 per group. \*\*\**p*<0.0001 when compared to control.



**Figure 3:** Spermidine and Aβ<sub>25-35</sub> induces nuclear jacob accumulation of hippocampal neurons through stimulation of extrasynaptic NMDARs. NMDA (200 μM) and spermidine (400 μM) increases nuclear Jacob localization (A, E). Aβ<sub>25-35</sub>-induced Jacob translocation to the nucleus it is blocked by co-incubation with traxoprodil (4nM) (B, F), or arcaine (C, G). Incubation of DFMO (5 μM) 10 min prior addition of Aβ<sub>25-35</sub>, also block Jacob translocation (D, H). Scale bars represents 10 μm. Data shown as mean + S.E.M., N: 17 – 24 cells per group. \*\*p < 0.001 and \*\*\*p < 0.0001 compared to control group.



**Figure 4:** Traxoprodil (B, C), arcaine (D, E) or DFMO (F, G) rescues dendritic spine number and morphology changes induced by Aβ<sub>25-35</sub> in hippocampal neuron cultures. (A) Representative micrographs depicting GFP-filled dendrites. Cells were incubated with Aβ<sub>25-35</sub> for 24 hours and traxoprodil (4 nM), arcaine (4 μM) or DFMO (5 μM) were added 2 hours prior fixation. Spine density and morphology analysis was performed in 20 μm dendrite segments. Spines were classified according to their morphology. Scale bar represent 5 μm. In each experiment 30 to 48 dendritic segments were analyzed Data shown as mean + S.E.M. \**p*<0.05, \*\**P*<0.001, \*\*\**P*<0.0001 compared to control group.



**Graphical Abstract legend:** 1)  $A\beta_{25-35}$ -induced memory impairment is rescued by negative modulation of polyamine system. Acute administration of traxoprodil, arcaine or DFMO restored memory of  $A\beta_{25-35}$ -injected mice. 2) Polyamine binding site at extrasynaptic NMDAR might underlie  $A\beta_{25-35}$ -induced cognitive deficits. Traxoprodil, arcaine or DFMO blocked  $A\beta_{25-35}$ -induced Jacob nuclear accumulation in hippocampal neuron cultures. 3) Extrasynaptic NMDAR activation leads to loss of synaptic contacts and reduction of dendritic spines.  $A\beta_{25-35}$ -induced dendritic spine loss and spine morphology changes are blocked by negative modulation of polyamine system.



## V.2. Artigo 2

Toxicol 76 (2013) 23–27



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicol](http://www.elsevier.com/locate/toxicol)

## The selective A-type K<sup>+</sup> current blocker Tx3-1 isolated from the *Phoneutria nigriventer* venom enhances memory of naïve and Aβ<sub>25-35</sub>-treated mice



Guilherme M. Gomes<sup>a,1</sup>, Gerusa D. Dalmolin<sup>a,1</sup>,  
Marta do Nascimento Cordeiro<sup>c</sup>, Marcus V. Gomez<sup>d,e</sup>, Juliano Ferreira<sup>a,b</sup>,  
Maribel A. Rubin<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Graduation Program in Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Building 18, Room 2203, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup> Graduation Program in Pharmacology, Building 21, Room 5218, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>c</sup> Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup> Graduate Program in Molecular Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Research Institute of Santa Casa de Belo Horizonte, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 June 2013

Received in revised form 7 August 2013

Accepted 13 August 2013

Available online 29 August 2013

#### Keywords:

A-type K<sup>+</sup> currents

Memory

Novel object recognition task

Alzheimer's disease

### ABSTRACT

Potassium channels regulate many neuronal functions, including neuronal excitability and synaptic plasticity, contributing, by these means, to mnemonic processes. In particular, A-type K<sup>+</sup> currents (*I<sub>A</sub>*) play a key role in hippocampal synaptic plasticity. Therefore, we evaluated the effect of the peptidic toxin Tx3-1, a selective blocker of *I<sub>A</sub>* currents, extracted from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on memory of mice. Administration of Tx3-1 (i.c.v., 300 pmol/site) enhanced both short- and long-term memory consolidation of mice tested in the novel object recognition task. In comparison, 4-aminopyridine (4-AP; i.c.v., 30–300 pmol/site), a non-selective K<sup>+</sup> channel blocker did not alter long-term memory and caused toxic side effects such as circling, freezing and tonic-clonic seizures. Moreover, Tx3-1 (i.c.v., 10–100 pmol/site) restored memory of Aβ<sub>25-35</sub>-injected mice, and exhibited a higher potency to improve memory of Aβ<sub>25-35</sub>-injected mice when compared to control group. These results show the effect of the selective blocker of *I<sub>A</sub>* currents Tx3-1 in both short- and long-term memory retention and in memory impairment caused by Aβ<sub>25-35</sub>, reinforcing the role of *I<sub>A</sub>* in physiological and pathological memory processes.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Voltage-gated K<sup>+</sup> channels (Kv) play a key role in many neural functions, including control of generation, frequency and temporal pattern of action potentials (AP) firing (Hille,

2001; Migliore and Shepherd, 2002). Mammalian Kv comprises four primary subfamilies of genes (Kv1, Kv2, Kv3, Kv4) (Coetzee et al., 1999), and permeates both delayed rectifier K<sup>+</sup> currents (*I<sub>K</sub>*) and transient outward K<sup>+</sup> currents (*I<sub>A</sub>*), the two main voltage-gated K<sup>+</sup> currents. In CA1 pyramidal neurons *I<sub>A</sub>* currents, encoded by Kv1.4, Kv4.2 or Kv4.3 channels, mediate the amplitude of action potential back-propagation (Hoffman et al., 1997) and set the threshold for long term potentiation (LTP) induction (Chen et al., 2006). An involvement of *I<sub>A</sub>* currents in Alzheimer's disease (AD)

\* Corresponding author. Av Roraima, 1000, prédio 18, sala 2206, Camobi, CEP 97105900, Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8978.

E-mail address: [maribel.rubin@gmail.com](mailto:maribel.rubin@gmail.com) (M.A. Rubin).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

pathology has been proposed, since it has been shown that A $\beta$  peptide, a hallmark of AD pathology, modulates these currents (Plant et al., 2006; Kerrigan et al., 2008), and the expression of Kv4.2 and Kv4.3 is found increased in the cortex and hippocampus of A $\beta$ -treated rats (Pan et al., 2004). Given the importance of  $I_A$  currents for synaptic plasticity (Chen et al., 2006; Kim and Hoffman, 2008), modulation of these currents might affect learning and memory processes.

When studying ionic channels, scientists often turn to nature's toolbox, in search of toxins and peptides with high specificity and affinity for a given channel. The venom of the Brazilian wandering spider *Phoneutria nigriventer* is rich in toxins that affect ionic channels and neurotransmitter release. The purified fraction 3 of *Phoneutria* venom (PhTx3) contains 6 toxin isoforms (Tx3-1 to -6) targeting mainly voltage-dependent calcium channels and potassium currents (Cordeiro et al., 1993; Gomez et al., 2002). In particular, it has been shown that the toxin Tx3-1 has inhibitory properties over  $I_A$ , without affecting any other  $K^+$  currents (Kushmerick et al., 1999).

The present study investigated the effect of the *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 on memory of naïve mice, and compared with the other potassium channel blocker, 4-aminopyridine (4-AP). Moreover, we tested whether intracerebroventricular (i.c.v.) injection of Tx3-1 rescue memory of A $\beta$ <sub>25-35</sub> injected mice, a recognized model of AD's cognitive impairment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Swiss mice (3 month old) were used. They were housed in plastic cages, with free access to water and food (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil), and were maintained on a 12 h/12 h light–dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00). Behavioral experiments were conducted in a sound-attenuated and air-regulated room, where the animals were habituated 1 h prior to experiments. All animal experimentation reported in this study was performed under established standards of the Brazilian law No. 11.794/2008 in accordance with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research.

### 2.2. Drugs and treatments

Purification of Tx3-1 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* was performed following the method of Cordeiro and coworkers (1993). A $\beta$ <sub>25-35</sub>, A $\beta$ <sub>35-25</sub> and 4-aminopyridine (4-AP), were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The Tx3-1 and 4-AP dose were based on electrophysiological experiments that evaluated the effect of both compounds on  $I_A$  currents (Kushmerick et al., 1999). A $\beta$  aggregation was performed according to Maurice et al. (1996), wherein 3 mM of either 25–35 or 35–25 (used as control) sequence peptide were incubated at 37 °C for 4 days, stored at –20 °C and freshly diluted to the final dose (3 nmol/site; 1 mM) when used. In all behavioral experiments, A $\beta$ <sub>25-35</sub>, A $\beta$ <sub>35-25</sub>, Tx3-1, 4-AP or vehicle, were

administered by intracerebroventricular (i.c.v.) route, according to Laursen and Belknap (1986). Briefly, mice were anesthetized with isoflurane until full anesthesia was achieved. The microinjections were performed using a Hamilton 10  $\mu$ l syringe connected to a specially made 28-gauge stainless steel needle with 3 mm in length. The needle was inserted directly through the skin and skull into the lateral ventricle, targeted by visualizing an equilateral triangle between the eyes and center of skull to locate bregma, then inserting the needle 1 mm laterally to this point. This avoids the use of unnecessary force since the needle penetrates at the suture line of the skull plates. Compounds were injected in a volume of 5  $\mu$ l over a 5 s period, followed by a 10 s delay to allow diffusion and prevent backflow. All injections were performed by an experimenter well trained in this technique.

### 2.3. Novel object recognition task

Novel object recognition task was performed in wooden chamber (30  $\times$  30  $\times$  30 cm) with black side and rear walls, front wall made of transparent acrylic and the floor covered with an ethyl vinyl acetate sheet. A light bulb, hanging 60 cm above the behavioral apparatus, provided constant illumination of about 40 lux, and an air-conditioner provided constant background sound isolation. The objects used were plastic mounting bricks, each of them with different shapes and colors, but same size. Throughout the experiments objects were used in a counterbalanced manner and animals did not previously display preference for any of the objects. Chambers and objects were thoroughly cleaned with 30% ethanol before each experiment.

Six days after A $\beta$  injection, novel object recognition task was performed according to Wang and coworkers (Wang et al., 2007), with minor modifications. The task consisted of habituation, training and testing sessions, each of them lasting 8 min. In the first session, mice were habituated to the behavioral apparatus, with no objects, and then returned to their home cages. Twenty-four hours later, training session took place, when animals were exposed to two equal objects (object A), and the exploration time was recorded with two stopwatches. Exploration was recorded when the animal touched or reached the object with the nose at a distance of less than 2 cm. Climbing or sitting on the object was not considered exploration. Immediately after training the animals received the following drug treatments: Tx3-1, 4-AP or vehicle. The test session was carried out 2 (short-term memory) or 24 (long-term memory) hours after training, when mice were placed back in the behavioral chamber and one of the familiar objects (i.e. object A) was replaced by a novel object (i.e. object B). 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 ( $[(T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}})/(T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})] \times 100$  (%)), and used as a memory parameter.

### 2.4. Assessment of adverse-effects

Aiming to identify any abnormal behavior that might arise from central administration of Tx3-1 or 4-AP, we

qualitatively monitored gross behavior of treated mice, such as convulsions, coordination problems, muscular weakness and paralysis (Dalmolin et al., 2011).

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 5.01. Values are given as mean + S.E.M.  $\chi^2$  test, one-way, two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) *post hoc* test, depending on the experiment. When possible, the effective dose 50% (ED<sub>50</sub>) values were calculated by nonlinear regression using a dose–response equation adjusted to provide the best description of the values of the individual experiments. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Tx3-1 enhances memory of naïve mice: comparison with the non-selective K<sup>+</sup> channel blocker 4-AP

In order to evaluate the effect of Tx3-1 on short-term and long-term memory of naïve mice, animals were injected with Tx3-1 immediately after training session and tested two or twenty-four hours afterward in the novel object recognition task. We found no significant difference in the amount of time animals of all groups spent exploring both the objects in the training session, indicating no biased exploration of the objects (data not shown).

Administration of Tx3-1 (i.c.v., 300 pmol/site) in naïve mice significantly increased the discrimination index for the novel object when compared to vehicle group, both for short-term memory (One-way ANOVA,  $F_{(4,27)} = 3.552$ ,  $p = 0.0188$  Fig. 1A) and long-term memory (One-way ANOVA,  $F_{(4,45)} = 4.265$ ,  $p = 0.0052$  Fig. 1B). Administration of Tx3-1 (i.c.v., 10–300 pmol/site) induced no visible adverse-effects in any dose tested (Table 1).

The effect of Tx3-1 on long-term memory was then compared with the non-selective K<sup>+</sup> channel blocker 4-AP. Administration of 4-AP (i.c.v., 30–300 pmol/site) did not alter the discrimination index for the novel object task when compared to vehicle group (One-way ANOVA,  $F_{(3,21)} = 1.063$ ,  $p = 0.3858$ , Fig. 1C). More important, administration of 4-AP induced toxic side effects, like circling (30 pmol/site), freezing (100 pmol/site) and tonic-clonic seizures (300 pmol/site), that started within 2–3 min after i.c.v. injection (Table 1).

### 3.2. Tx3-1 administration reverses A $\beta_{25-35}$ – induced memory impairment

We next tested the effect of Tx3-1 on long-term memory of A $\beta_{25-35}$ -treated animals. Injection of A $\beta_{25-35}$ , 7 days prior to the novel object recognition task, significantly decreased the discrimination index of mice when compared to A $\beta_{35-25}$  group (Fig. 2). Administration of Tx3-1 (i.c.v., 10–100 pmol/site) significantly restored the discrimination index of A $\beta_{25-35}$ -injected mice to the same level of A $\beta_{35-25}$  group. Interestingly, Tx3-1 exhibited higher potency to improve long-term memory of A $\beta_{25-35}$ -treated mice [(ED<sub>50</sub> = 2.0 (0.8–5.4 pmol/site), Fig. 2] than A $\beta_{35-25}$ -

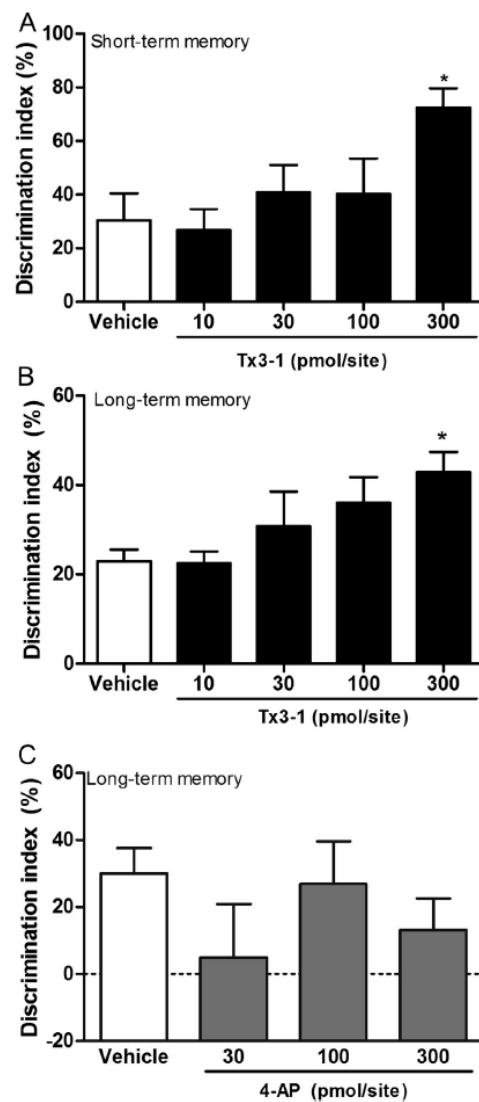


Fig. 1. I.c.v. administration of Tx3-1 (10–300 pmol/site) enhances short-term (A) and long-term (B) memory of naïve mice in the novel object recognition task. I.c.v. administration of 4-AP (30–300 pmol/site) did not alter long-term memory of naïve mice (C). Short-term memory was tested 2 h after training and long-term memory 24 h after training. Tx3-1 and 4-AP were injected immediately after training. Each column represents the mean of 6–14 animals, and vertical lines show the SEM. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by SNK posttest; \* $p < 0.05$  denotes significance level when compared to control.

treated mice [(ED<sub>50</sub> = 40.3 (10.3–158.4 pmol/site), Fig. 1B)]. Statistical analysis (Two-way ANOVA) revealed a significant effect of Tx3-1 treatment on discrimination index of A $\beta_{25-35}$ -treated mice ( $F_{(3,43)} = 11.67$ ,  $p = 0.0001$ , Fig. 2).

**Table 1**  
Adverse-effect assessment of Tx3-1 and 4-AP.

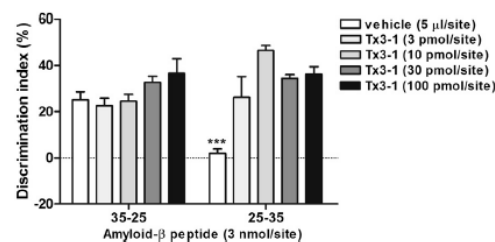
Group	Dose (pmol/site)	Adverse-effect assessment		
		Circling	Freezing	Tonic-clonic seizures
Vehicle	–	0/6	0/6	0/6
Tx3-1	10	0/6	0/6	0/6
	30	0/6	0/6	0/6
	100	0/6	0/6	0/6
4-AP	300	0/5	0/5	0/5
	30	3/4*	0/4	0/4
	100	0/4	4/4**	0/4
	300	0/4	0/4	4/4**

$\chi^2$  test, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , significance level in comparison with control (vehicle) group.

#### 4. Discussion

The venom of the Brazilian wandering spider *Phoneutria nigriventer* is a rich source of biologically active peptides, including the toxin Tx3-1, a selective blocker of  $I_A$  currents. Here we showed that i.c.v. administration of Tx3-1 enhanced both short- and long-term memory of animals tested in the novel object recognition task, without producing any detectable adverse-effects. Moreover, Tx3-1 administration reversed the  $A\beta_{25-35}$ -induced memory impairment, an established animal model of AD.

A-type  $K^+$  currents ( $I_A$ ) play a key role in controlling neuronal excitation (Hoffman et al., 1997), mainly through regulation of EPSP and backpropagating action potential amplitude (Chen et al., 2006; Ramakers and Storm, 2002). Thus, modulation of  $I_A$  currents might as well modulate synaptic plasticity. Chen and coworkers (Chen et al., 2006) have shown that hippocampal  $I_A$  currents are crucial for setting the threshold for LTP induction, since deletion of  $Kv4.2$ , which eliminates  $I_A$ , determines a lower threshold for LTP induction in a theta burst pairing protocol. Furthermore, upon LTP induction, in hippocampal organotypic slice cultures,  $I_A$  currents undergo a progressive long-term decrease (Jung and Hoffman, 2009). Given that LTP is considered the cellular mechanism for memory acquisition, it is reasonable to think that modulation of  $I_A$  currents would impact memory storage capacity. Here,



**Fig. 2.** I.c.v. administration of Tx3-1 restores long-term memory of  $A\beta_{25-35}$ -injected mice in the novel object recognition task. Long-term memory was tested 24 h after training. Tx3-1 (3–100 pmol/site) was injected immediately after training. Each column represents the mean of 6–8 animals, and vertical lines show the SEM. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance (ANOVA); \*\*\* $p < 0.001$  denotes significance level when compared to  $A\beta_{35-25}$ -injected mice.

using behavioral techniques, we showed *in vivo* evidence that inhibition of  $I_A$  currents enhance memory consolidation, since i.c.v. administration of the  $I_A$  blocker Tx3-1 improved short- and long-term memory of mice subjected to the novel object recognition task.

We also examined the effect of the non-selective Kv channel blocker 4-AP, applied at the same experimental conditions that Tx3-1, on memory of mice. The i.c.v. injection of 4-AP had no effect on memory, but induced shaking, circling and tonic-clonic seizures at the higher doses tested. In fact, clinical trials have shown that although 4-AP improves cognitive functions in AD patients, the incidence of adverse-effects has hindered its clinical use (Davidson et al., 1988; Wiseman and Jarvik, 1991). Interestingly, the analysis of amino acid sequence of Tx3-1 shows no relation to other  $K^+$  channel blockers (Cordeiro et al., 1993). The lack of homology with other known blockers of  $K^+$  channels could explain the selective pattern of toxin against  $I_A$  currents, and thus a possible better therapeutic profile when compared to the non-selective Kv blocker 4-AP.

*In vitro* experiments shed light on the involvement of  $I_A$  currents in AD's cognitive decline (Kerrigan et al., 2008; Pan et al., 2004; Plant et al., 2006). The  $A\beta$  peptide, which accumulates in the brain of AD patients (Fraser et al., 1997; Prince et al., 2009), alters synaptic plasticity (Holscher et al., 2007; Cheng et al., 2009), and ion channel function, such as potassium ( $K^+$ ) channels (Furukawa et al., 1996). Moreover, current evidences suggest a role for  $A\beta$  peptides in  $I_A K^+$  currents regulation (Kerrigan et al., 2008; Pan et al., 2004; Plant et al., 2006). Therefore, we evaluated whether Tx3-1 alter  $A\beta_{25-35}$ -induced memory deficits in mice. Administration of Tx3-1, immediately after training session, reversed the  $A\beta_{25-35}$ -induced memory impairment. Interestingly, Tx3-1 proved to be more potent in  $A\beta_{25-35}$ -treated mice when compared to the control group. One of the causes of this better effect could be attributed to the enhanced expression of cortical and hippocampal  $I_A K^+$  channels induced by  $A\beta_{25-35}$  (Pan et al., 2004). The higher potency of Tx3-1 in AD-like conditions makes this toxin a potential prototype for the emergence of more effective therapies for AD-related cognitive decline. In line with this view, Tx3-1 has been produced through bacterial expression system (Carneiro et al., 2002). This molecular biological technique is useful to produce not only the recombinant toxin but also to generate mutated versions of the native peptide.

Here we reported the memory enhancing effect of Tx3-1, a selective  $I_A$  blocker, in physiological and AD-like conditions in mice. Despite the data showed here, more experiments, such as electrophysiological techniques, are needed to better elucidate the effect of Tx3-1 on neuronal mechanisms involved in memory storage.

#### Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq, Brazil – 306164/2010-8, 481664/2010-6, 476551/2009-9), Toxinologia – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes 2865/2010, 1444/2011), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Medicina Molecular (MCT/

CNPq) and FAPEMIG. We thank CNPq, CAPES and FAPEMIG for the fellowship support.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Carneiro, A.M.D., Kushmerick, C., Koenen, J., Arndt, M.H.L., Cordeiro, M.N., Chavez-Olortegui, C., Diniz, C.R., Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Prado, M.A.M., Prado, V.F., 2002. Expression of functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K<sup>+</sup> channels. *Toxicon* 41, 305–313.
- Chen, X., Yuan, L., Zhao, C., Birnbaum, S.G., Frick, A., Jung, W.E., Schwarz, T.L., Sweatt, J.D., Johnston, D., 2006. Deletion of *Kv4.2* gene eliminates dendritic A-type K<sup>+</sup> current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 26 (47), 12143–12151.
- Cheng, L., Yin, W.J., Zhang, J.F., Qi, J.S., 2009. Amyloid  $\beta$ -protein fragments 25–35 and 31–35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo. *Synapse* 63, 206–214.
- Coetzee, W.A., Amarill, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B., 1999. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 233–285.
- Cordeiro, M.doN., de Figueiredo, S.G., Valentim, A.doC., Diniz, C.R., von Eickstedt, V.R., Gilroy, J., Richardson, M., 1993. Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 31, 35–42.
- Dalmolin, G.D., da Silva, C.R., Rigo, F.K., Gomes, G.M., Cordeiro, M.doN., Richardson, M., da Silva, M.A.R., Prado, M.A.M., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2011. Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. *Pain* 152 (10), 2224–2232.
- Davidson, M., Zemishlany, Z., Mohs, R.C., Horvath, T.B., Powchik, P., Blass, J.P., Davis, K.L., 1988. 4-Aminopyridine in the treatment of Alzheimer’s disease. *Biol. Psychiatry* 23, 485–490.
- Fraser, S.P., Suh, Y.H., Djamgoz, M.B., 1997. Ionic effects of the Alzheimer’s disease beta-amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *Trends Neurosci.* 20, 67–72.
- Furukawa, K., Barger, S.W., Blalock, E.M., Mattson, M.P., 1996. Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379, 74–78.
- Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Guatimosim, C., Prado, M.A., 2002. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 579–588.
- Hille, B., 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, third ed. Sinauer, Sunderland.
- Hoffman, D.A., Magee, J.C., Colbert, C.M., Johnston, D., 1997. K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387, 869–875.
- Holscher, C., Gengler, S., Gault, V.A., Harriott, P., Mallot, H.A., 2007. Soluble beta-amyloid[25–35] reversibly impairs hippocampal synaptic and spatial learning. *Eur. J. Pharm.* 561 (1–3), 85–90.
- Jung, S., Hoffman, D.A., 2009. Biphasic somatic A-type K<sup>+</sup> channel downregulation mediates intrinsic plasticity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS ONE* 4 (8), e6549.
- Kerrigan, T.L., Atkinson, L., Peers, C., Pearson, H.A., 2008. Modulation of “A”-type K<sup>+</sup> current by rodent and human forms of amyloid beta protein. *Neuroreport* 19 (8), 839–843, 28.
- Kim, J., Hoffman, D.A., 2008. Potassium channels: new found players in synaptic plasticity. *Neuroscientist* 14 (3), 276–286.
- Kushmerick, C., Kalapothakis, E., Beirão, P.S.L., Penaforte, C.L., Prado, V.F., Cruz, J.S., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Gomez, M.V., Romano-Silva, M.A., Prado, M.A.M., 1999. *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K<sup>+</sup> currents controlling Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency in GH<sub>3</sub> cells. *J. Neurochem.* 72, 1472–1481.
- Laursen, S.E., Belknap, J.K., 1986. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J. Pharmacol. Method* 16, 355–357.
- Maurice, T., Lockhart, B.P., Privat, A., 1996. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* 706, 181–193.
- Migliore, M., Shepherd, G.M., 2002. Emerging rules for the distribution of active dendritic conductance. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 362–370.
- Pan, Y., Xu, X., Tong, X., Wang, X., 2004. Messenger RNA and protein expression analysis of voltage-gated potassium channels in the brain of A $\beta$ 25–35-treated rats. *J. Neurosci.* 24, 94–99.
- Plant, L.D., Webster, N.J., Boyle, J.P., Ramsden, M., Freier, D.B., Peers, C., Pearson, H.A., 2006. Amyloid  $\beta$  peptide as a physiological modulator of “A”-type K<sup>+</sup> currents. *Neurobiol. Aging* 27, 1673–1683.
- Prince, M., Bryce, R., Ferri, C., 2009. *World Alzheimer Report – the Benefits of Early Diagnosis and Intervention*. Alzheimer’s Disease International, London.
- Ramakers, G.M., Storm, J.F., 2002. A transient postsynaptic K<sup>+</sup> current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10144–10149.
- Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Mouri, A., Mizoguchi, H., Nitta, A., Chen, W., Nabeshima, T., 2007. The Allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid<sub>25–35</sub> i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology* 32, 1261–1271.
- Wiseman, E.J., Jarvik, L.F., 1991. Potassium channel blockers: could they work in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 5, 25–30.