

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**Avaliação do efeito neuroprotetor de nanocápsulas contendo
indometacina em modelos da Doença de Alzheimer**

André Bevilacqua Meneghetti

Porto Alegre, junho de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**Avaliação do efeito neuroprotetor de nanocápsulas contendo
indometacina em modelos da Doença de Alzheimer**

André Bevilacqua Meneghetti

Trabalho de conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Profa. Dra. Christianne Gazzana Salbego

Orientadora

MSc Rudimar Luiz Frozza

Co-orientador

Porto Alegre, junho de 2011

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista *Neurobiology of Disease*, apresentadas em Anexo.

**Avaliação do efeito neuroprotetor de nanocápsulas contendo
indometacina em modelos da Doença de Alzheimer**

André Meneghetti^a, Rudimar Frozza^a, Andressa Bernardi^b, Juliana Hoppe^a, Ana Maria Battastini^a, Adriana R. Pohlmann^c, Sílvia S. Guterres^b, Christianne Salbego^{a*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia

^c Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor Correspondente:

Dra. Christianne Salbego (salbego@terra.com.br)

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo I, Laboratório 23, 90035-
003, Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: +55 (51) 3308.5570 ; FAX: +55 (51) 3308.5535

Resumo

A presença da neuroinflamação crônica é relatada no cérebro de pacientes que apresentam a Doença de Alzheimer (DA), evidenciada pela ativação glial, desempenhando um papel central na neurotoxicidade desencadeada pelo β -amilóide. Considerando que a biodisponibilidade da indometacina é limitada, sistemas nanoparticulados representam uma alternativa promissora para melhorar a biodisponibilidade cerebral. O presente estudo avaliou o potencial efeito neuroprotetor da indometacina nanoencapsulada (IndOH-NC) em modelos *in vitro* e *in vivo* da DA. Culturas organotípicas de hipocampo de ratos foram expostas a 2 μ M do A β 1-42 por 48h com ou sem tratamentos de 50 ou 100 μ M de IndOH-NC. Nossos resultados mostraram que o A β causou intenso dano celular e que tratamento com 50 ou 100 μ M de IndOH-NC reduziu a morte celular, reduziu significativamente a ativação da JNK e o imunoconteúdo da GFAP, além de diminuir a liberação da IL-6 no meio de cultivo. Adicionalmente, 2nmol de A β 1-42 foram injetados bilateralmente no ventrículo de ratos *Wistar* machos tratados com Indometacina (IndOH) ou IndOH-NC (1 mg/Kg/dia/14 dias). O déficit de memória induzido pelo A β foi significativamente reduzido apenas pelo tratamento com IndOH-NC, o que pode ser explicado pelo aumento na biodisponibilidade cerebral proporcionado pelas nanocápsulas quando comparado ao tratamento com IndOH. Além disso, houve diminuição da reatividade da IB₄ e do imunoconteúdo da GFAP. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a redução da neuroinflamação está envolvida no efeito neuroprotetor da indometacina nanoencapsulada. Embora a indometacina não seja comumente utilizada na terapia da DA, nossos resultados sugerem que este fármaco, quando nanoencapsulado, poderia ser um potencial candidato para o tratamento desta patologia.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, β -Amilóide, Indometacina, Nanocápsulas poliméricas, Neuroinflamação, Sinalização Celular, Neuroproteção.

Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência entre a população idosa, correspondendo a 60-70% de todos os casos (Philipson *et al.*, 2010). Estima-se que em 2011 mais de 35,6 milhões de pessoas em todo o mundo apresentem a DA. Este número tende a aumentar nos próximos anos devido ao crescimento da expectativa de vida da população, uma vez que a idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento desta doença (Ittner *et al.*, 2011; Querfurth *et al.*, 2010; US Alzheimer's Association, 2011). Os sintomas clínicos da DA resultam da deterioração de domínios cognitivos seletivos, em especial aqueles relacionados com a memória (LaFerla *et al.*, 2007). Em nível molecular, trata-se de uma progressão complexa que envolve uma cascata de interações patológicas seqüenciais, incluindo a agregação do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) através da clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP - **A**myloid **P**recursor **P**rotein) por β - e γ -secretases com o desenvolvimento de placas senis (PSs), e a hiperfosforilação e agregação da proteína *tau* (τ) formando os emaranhados neurofibrilares (ENFs). Juntamente a processos associados, como inflamação e estresse oxidativo, essas cascatas patológicas contribuem para a perda sináptica e a neurodegeneração progressiva (Zhang *et al.*, 2011; Sakono *et al.*, 2010). Segundo o FDA (*US Food and Drug Administration*), cinco medicamentos são aprovados para serem utilizados na DA, porém estes se limitam apenas ao tratamento dos sintomas da doença, não impedindo o seu progresso. Sendo assim, a busca de novos fármacos capazes de modificar o progresso da doença se torna fundamental para melhorar o prognóstico dos pacientes.

Outra característica marcante no cérebro de pacientes com DA é a presença de uma neuroinflamação crônica, principalmente associada às lesões neuropatológicas (PSs e ENFs). Diversos trabalhos descritos na literatura demonstram a relação entre o processo inflamatório e a toxicidade desencadeada pelo $A\beta$ no tecido cerebral. Células como os astrócitos e a microglia envolvidas neste processo, estão ativadas em áreas próximas às lesões induzidas pelo peptídeo (Gasparini *et al.*, 2004; Sastre *et al.*, 2008). Uma vez estimulada, a microglia libera uma ampla variedade de mediadores pró-inflamatórios incluindo citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α), componentes do

sistema complemento, glutamato, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), além de aumentar a produção do A β (Heneka *et al.*, 2010). Estes mediadores inflamatórios, associados à ativação de complexas cascatas de sinalização intracelular, causam toxicidade para os neurônios, estando implicados no mecanismo responsável por exacerbar a neurodegeneração presente na DA (Block *et al.*, 2005). Estas observações indicam que o processo inflamatório apresenta um papel central na patogênese da DA. Dessa forma, os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) podem ser efetivos na prevenção e no tratamento da DA (In't Veld *et al.*, 2001).

Os AINEs são fármacos amplamente prescritos que apresentam propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. Seus efeitos são principalmente atribuídos à inibição da atividade enzimática da ciclooxigenase (COX), diminuindo desta forma a síntese de prostaglandinas (Burian *et al.*, 2005). Recentes evidências indicam que alguns AINEs inibem especificamente a secreção do peptídeo A β tanto em culturas de células como em modelos *in vivo* da DA, e este mecanismo parece não estar relacionado com a inibição da ciclooxigenase (COX) (Weggen *et al.*, 2001, 2003). Entretanto, seu uso está associado a uma elevada incidência de reações adversas no trato gastrointestinal (TGI) (Perini *et al.*, 2004).

A indometacina é um fármaco derivado do ácido indolacético que pertence à classe dos AINEs, apresentando uma potente atividade antiinflamatória além de ação analgésica e antipirética. Sua atividade está baseada na inibição não seletiva da ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (Botting, 2006; Patrignani, 2000). A absorção da indometacina após administração oral é rápida com pico de concentração plasmática ocorrendo 1-2h após administração. A ligação da indometacina às proteínas plasmáticas e aos tecidos pela indometacina é alta, cerca de 90%, o que gera uma baixa biodisponibilidade cerebral, uma vez que há pouco fármaco livre na circulação e assim dificulta a passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) (Reynolds, 1993; Bruton *et al.*, 2008; Parepally *et al.*, 2006). Uma alternativa para contornar esta baixa biodisponibilidade cerebral e reduzir os efeitos tóxicos dos AINEs, dentre eles a indometacina, seria a associação do fármaco a sistemas carreadores, como as nanopartículas (Ammoury *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2001; Pohlmann *et al.*, 2002).

Nanopartículas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam tamanho entre 10 a 1000nm. As nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso no qual poderá conter o fármaco dissolvido ou adsorvido à parede polimérica, dependendo das características físico-químicas e da composição da nanocápsula (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Além disso, sistemas nanoencapsulados se mostraram como promissores vetores devido a sua capacidade modular a liberação de fármacos (Cruz *et al.*, 2006). A vetorização em órgãos, tecidos ou células específicas também apresenta como vantagem a diminuição de efeitos adversos apresentados sistemicamente pelo fármaco não vetorizado (Guterres *et al.*, 2001; Bernardi *et al.*, 2009a). Assim, o transporte de fármacos para o SNC tem se tornado um importante componente na pesquisa terapêutica utilizando a nanotecnologia (Legrand *et al.*, 1999; Barratt, 2000; Chaubal, 2004)

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial efeito neuroprotetor da indometacina nanoencapsulada frente a lesão celular e a neuroinflamação induzida pelo peptídeo A β 1-42 em modelos *in vitro* e *in vivo* da DA.

Materiais e métodos

Preparação das nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (Jäeger *et al.*, 2009). A 40°C, indometacina (0,010g), poli(ϵ -caprolactona) (0,100g), triglicerídeos cáprico/caprílico (0,33mL) e monoestearato de sorbitano (0,038g) foram dissolvidos em acetona (27mL). Em um frasco separado, polissorbato 80 (0,038g) foi adicionado a 53mL de água. A solução orgânica foi vertida sobre a fase aquosa sob agitação constante a temperatura ambiente. Após 10min, a acetona foi eliminada e a suspensão concentrada sob pressão reduzida. O volume final foi ajustado para 10mL. A formulação controle foi preparada como descrito acima, sem adição da indometacina.

Caracterização das nanocápsulas

Após o preparo, os valores de pH da suspensão de nanocápsulas foram determinados usando um potenciômetro (Micronal B-474). O tamanho das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta das suspensões foram determinados (Zetasizer® nano-ZS ZEN modelo 3600 - Malvern, UK). As amostras foram diluídas com água (MilliQ®) (tamanho da partícula e índice de polidispersão) ou 10mM de uma solução aquosa de NaCl (potencial zeta). A concentração total de indometacina nas formulações foi determinada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa (Perkin-Elmer S-200, com injetor S-200, detector UV-vis, pré-coluna e uma coluna Lichrospher 100 RP-18 de 250mm, 4mm e 5µm; Merck). A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila/água (70:30, v/v) ajustada para pH 5±0,5 com ácido acético 10% (v/v). Cada uma das suspensões (100µL) foi tratada com acetonitrila (10mL); a solução foi filtrada (Millipore 0,45µm) e injetada (20µL) no CLAE. O método utilizado no CLAE foi previamente validado (Pohlmann *et al.*, 2004). Uma curva de calibração linear para indometacina foi obtida na faixa de 1-25µg/mL com coeficiente de correlação superior a 0,9992.

Preparo do peptídeo Aβ1-42

O peptídeo Aβ1-42 (Bachem, Torrance, CA, USA) foi solubilizado em PBS (1mg/mL) e estocado a -20°C. Para promover a fibrilação e a agregação previamente à indução da neurotoxicidade, a solução do Aβ1-42 foi incubada a 37°C por 4 dias (Frozza *et al.*, 2009).

Neurotoxicidade do Aβ1-42 in vitro

Cultura organotípica de hipocampo

A cultura organotípica de hipocampo de ratos *Wistar* de 6-8 dias foi preparada segundo o método descrito por Stoppini *et al.* (1991), adaptado pelo nosso grupo (Frozza *et al.*, 2009; Hoppe *et al.*, 2010). Todos os procedimentos

utilizados no presente estudo seguiram os “Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório” do NIH publicação nº 85-23 e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFRGS, protocolo número 2007977). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais e o seu sofrimento. O cérebro foi retirado e o hipocampo dissecado, fatias de 400µm foram preparadas usando um fatiador de tecidos *Mcllwain chopper* (The Mickle Laboratory Engineering Co), e separadas em HBSS gelado (Hank’s balanced salt solution), pH 7,2. As fatias foram colocadas sobre membranas Millicell® e transferidas para placas de cultura de 6 poços. Cada poço continha 1mL de meio de cultura constituído de 50% MEM (*Medium Essential Minimal*), 25% HBSS e 25% de soro de cavalo inativado suplementado com 36 mM de glicose, 25mM de HEPES, 4mM de NaHCO₃, antibiótico (sulfato de gentamicina 0,100mg/mL) e antifúngico (anfotericina B 1%), pH 7,3. As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂ por 30 dias. O meio de cultivo foi trocado 2 vezes por semana.

Tratamento das culturas

Para estabelecer a neurotoxicidade induzida pelo Aβ *in vitro*, após um período de 28 dias em cultivo, a quantidade de soro no meio de cultivo foi reduzida para 5% e as culturas expostas a 2µM do peptídeo Aβ1-42. A indometacina nanoencapsulada (IndOH-NC – 50 ou 100µM) foi adicionada simultaneamente à exposição do Aβ1-42 e mantida por um período de 48h.

Quantificação da morte celular

A morte celular foi avaliada pela análise da incorporação do iodeto de propídeo (IP) (Noraberg *et al.*, 1999). Após 46h de exposição ao peptídeo Aβ1-42 e aos tratamentos com a IndOH-NC, 5µM do IP foram adicionados ao meio de cultura e incubado por 2h. As culturas foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) usando um filtro padrão de rodamina. As imagens foram capturadas e analisadas usando o programa Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). A área onde a fluorescência do IP foi detectada acima dos níveis de “background” foi determinada usando a opção “density

slice” do programa Scion Image e comparada com a área total da fatia para obter a percentagem de lesão.

Dosagem da citocina IL-6

Após a exposição ao A β 1-42 e ao tratamento com IndOH-NC, o meio de cultivo foi coletado e rapidamente congelado a -20 °C para posterior dosagem da citocina IL-6, usando um kit específico para a detecção da imunoabsorção enzimática (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems).

Neurotoxicidade do A β 1-42 in vivo

Animais

Os experimentos foram conduzidos usando ratos *Wistar* machos, pesando entre 300-350g, obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS – Porto Alegre, Brasil). Os animais foram mantidos em ambiente controlado (temperatura de 22 \pm 2°C, umidade de 50 - 60%, sob ciclo de 12h claro/escuro – luz às 6:00), cinco animais por caixa com água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo seguiram os “Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório” do NIH publicação nº 85-23 e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFRGS, protocolo número 2007977). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais e o seu sofrimento.

Cirurgia e injeção do A β 1-42

Os animais foram anestesiados com Equitesina (3,5mL/Kg via intraperitoneal) e colocados no estereotáxico (Insight Equipamentos Científicos). O A β 1-42 (2nmol em 10 μ L) foi injetado intracerebroventricularmente (icv) a uma taxa de 1 μ L/min nos ventrículos laterais usando uma micro-seringa Hamilton (10 μ L) equipada com uma agulha 26S. As coordenadas para a

injeção foram AP 0,8mm; ML 1,5mm; DV 3,5mm, determinadas de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1982). Animais controles foram injetados com a mesma quantidade de PBS.

Tratamento dos animais

Após 24h da injeção icv do A β 1-42, os animais foram divididos em 7 grupos: (1) animais que receberam injeção icv de PBS (Grupo PBS), (2) injeção icv de PBS e tratados com indometacina solução (IndOH) (Grupo PBS-IndOH), (3) injeção icv de PBS e tratados com IndOH-NC (Grupo PBS-IndOH-NC), (4) injeção icv do A β 1-42 (Grupo A β 1-42), (5) injeção icv do A β 1-42 e tratados com nanocápsulas sem o fármaco (Grupo NC), (6) injeção icv do A β 1-42 e tratados com IndOH (Grupo A β -IndOH) e (7) injeção icv do A β 1-42 e tratados com IndOH-NC (Grupo A β -IndOH-NC). O tratamento iniciou-se 24h após a cirurgia estereotáxica. A IndOH-NC foi preparada como descrito acima e a IndOH foi solubilizada (1mg/mL) em carbonato de cálcio 3%. Cada animal recebeu uma dose diária de 1mg/kg de IndOH ou IndOH-NC i.p. por um período de 14 dias.

Análise comportamental

Após 14 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste comportamental de Reconhecimento de Objetos (Bevins and Besheer, 2006). Este teste é baseado na tendência espontânea de roedores explorarem novos objetos com frequência maior do que objetos familiares. O aparato para realização do teste consistiu de uma câmara de madeira de pequeno porte (25X25X100cm). A iluminação da sala foi diminuída durante a realização do teste. Os objetos apresentavam semelhantes texturas, cores e tamanhos, mas diferentes formas. Os objetos foram colocados perto dos dois cantos em cada extremidade de um dos lados da câmara e os animais foram colocados individualmente na câmara de frente para o centro da parede oposta a dos objetos. Na primeira etapa do teste, os animais foram submetidos a um treinamento. Dois objetos idênticos (Objeto A e A1) foram colocados nos cantos de uma câmara e foi analisado o tempo gasto na exploração de cada objeto pelo animal por um período de 5min. Para avaliar a memória de curta

duração, após um intervalo de 3h um objeto familiar (Objeto A) permaneceu na câmara e um novo objeto foi inserido (Objeto B) e novamente analisou-se o tempo de exploração de cada objeto por um período de 5min. Para avaliar a memória de longa duração, 24h após o treinamento, um dos objetos foi novamente substituído por um novo (Objeto C) e a atividade exploratória do animal foi verificada por um período de 5min. A exploração do objeto foi considerada quando o animal tocou o objeto com as patas dianteiras ou com o focinho, mordeu, lambeu ou cheirou o objeto a uma distância de não mais que 1,5cm. Todo o experimento foi registrado em vídeo utilizando o *software* ANY-MAZE. Os resultados foram apresentados na forma de índice de reconhecimento (índice de memória), onde um escore próximo de zero indica nenhuma preferência pelo objeto novo ou familiar, calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\left(\frac{\text{Tempo explorando o objeto específico}}{\text{Tempo explorando o objeto novo} + \text{Tempo explorando o objeto familiar}} \right) \times 100$$

Determinação das enzimas hepáticas no soro

Após análise comportamental, sob profunda anestesia, foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca para determinação das enzimas hepáticas. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 xg por 10min a 4°C. O soro foi armazenado a -20°C para posterior análise da atividade das enzimas hepáticas γ -glutamilttransferase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Quantificação do fármaco no tecido cerebral

Após o tratamento e análise comportamental, os animais foram mortos por dose letal de Equitesina, o cérebro foi retirado e homogeneizado em 5,0mL de acetonitrila. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para um tubo cônico de 50mL, agitadas em vortex por 5min seguido de centrifugação a

2800 *xg* por 30min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e filtrado (Millipore 0,45µm) para posterior análise em CLAE.

Western Blotting

No modelo *in vitro*, após obter as imagens fluorescentes, as fatias foram lisadas em tampão de lise (4% de dodecilsulfato de sódio – SDS, 2mM de EDTA, 50mM de Tris). Alíquotas foram retiradas para determinação de proteínas (Peterson, 1983) e β-mercaptoetanol foi adicionado a uma concentração final de 5%. De forma semelhante, no modelo *in vivo* o hipocampo dos animais foi homogeneizado em tampão de lise e centrifugado a 3000 *xg* por 20min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, uma alíquota foi retirada para determinação da quantidade de proteínas conforme descrito acima. As proteínas foram separadas (50-100µg por poço) em gel de eletroforese de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) com concentrações de 10-12%. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparato Trans-Blot® SD (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As membranas foram incubadas por 60min a 4°C em solução de bloqueio (tampão Tris com 5% de leite e 0,1% de Tween® 20, pH 7,4) . Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário apropriado diluído em solução de bloqueio por um período de 12h a 4°C sob agitação. Os anticorpos primários para as proteínas a seguir foram utilizados: GFAP (1:2000; Sigma), p-SAPK/JNK (1:1000; Cell Signaling), SAPK/JNK (1:1000; Cell Signaling), β-actina (1:1000; Cell Signaling). As membranas foram então incubadas com anticorpos secundários específicos conjugados à peroxidase. A quimioluminescência (ECL, Amersham) foi detectada usando filmes de raio-X (Kodak). Os filmes foram escaneados e o percentual de intensidade das bandas foi analisado usando o programa Optiquant (Packard Instrument). Os resultados foram expressos como percentagem dos valores do controle.

Reatividade da Isolectina B₄

A glicoproteína Isolectina B₄ (IB₄) é utilizada como marcador específico de células do sistema imunológico (Streit and Kreuzberg, 1987; Hailer *et al.*, 2005). Conforme descrito acima, 50µg de proteínas foram separadas em SDS-PAGE 8%. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas por um período de 24h utilizando solução de bloqueio (5% de albumina e 2% de Tween[®] 20 em PBS, pH 7,4) a 4°C sob agitação. Isolectina B₄ conjugada à peroxidase (Sigma) foi incubada por 12h em PBS em uma concentração final de 0,24µg/mL. A quimioluminescência foi detectada conforme descrito anteriormente.

Análise estatística

Resultados foram expressos como média±desvio padrão e analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Diferenças entre valores médios foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Caracterização físico-química da formulação de nanocápsulas

Todas as formulações de nanocápsulas foram preparadas pelo método da deposição interfacial de polímeros sem a necessidade de nenhum passo subsequente para purificação. IndOH-NC e NC apresentaram aspecto macroscópico branco leitoso opalescente e homogêneo. Após a preparação, o diâmetro médio da IndOH-NC foi 261,36±4nm e da NC foi 236±3nm. As suspensões apresentaram distribuição de tamanho monomodal e índice de polidispersão menores que 0,17±0,02 e 0,19±0,003, respectivamente, indicando estreita distribuição de tamanho. Os valores de pH foram de 5,87 para IndOH-NC e 6,05 para NC. O potencial zeta foi -16,14±1,14 e -13,8±2,9 mV, respectivamente. O conteúdo de indometacina foi de 0,991±0,012mg/mL e a eficiência da encapsulação foi superior a 99,9%.

Indometacina nanoencapsulada reduz a morte celular desencadeada pelo peptídeo A β 1-42

A morte celular induzida pela exposição das culturas organotípicas ao peptídeo A β 1-42 foi avaliada através do percentual de incorporação do IP. A concentração de 2 μ M do A β 1-42 causou um aumento significativo na incorporação do IP quando comparada ao controle e o tratamento com IndOH-NC (50 e 100 μ M) diminuiu esta fluorescência (Fig. 1A). A quantificação da fluorescência mostrou que após 48h de exposição ao A β 1-42 houve um aumento significativo na incorporação do IP quando comparado aos controles (28,3 \pm 5,3% de morte celular) (Fig. 1B). O tratamento com IndoOH-NC em ambas as concentrações foi capaz de diminuir de forma significativa este aumento provocado pelo A β 1-42 para valores de 9,01 \pm 0,8% e 13,2 \pm 3,9%, respectivamente (p <0,001) (Fig. 1B). Por outro lado, o tratamento apenas com IndOH-NC não alterou o percentual de incorporação do IP quando comparado ao controle (cerca de 2% de incorporação), indicando que o fármaco não exerceu nenhum efeito tóxico para as culturas (Fig. 1B).

Tratamento com indometacina nanoencapsulada previne o aumento da liberação de IL-6 induzido pelo A β 1-42

Para melhor avaliar o mecanismo pelo qual a IndOH-NC diminuiu a morte celular causada pelo peptídeo A β 1-42, conforme mostrado na Fig. 1B, foi avaliado o nível da citocina pró-inflamatória IL-6 no meio de cultivo 48h horas após a exposição ao A β 1-42. As culturas que receberam 2 μ M do A β 1-42 apresentaram um aumento significativo na liberação de IL-6 quando comparadas ao controle (2975,8 \pm 230 pg/mL) (Fig. 2). Os resultados mostraram que os tratamentos com 50 e 100 μ M de IndOH-NC preveniram de forma significativa a liberação de IL-6 (805,23 \pm 128 e 858,72 \pm 151; respectivamente, p <0,001) (Fig. 2).

Indometacina nanoencapsulada reduz o déficit cognitivo causado pelo A β 1-42

Na tentativa de analisar se a indometacina reduz o déficit cognitivo observado em decorrência da neurodegeneração, foi utilizado um modelo *in vivo* de toxicidade do peptídeo A β 1-42 no qual 2 nmol do peptídeo foi injetado intracerebroventricularmente no cérebro de ratos, mimetizando a DA. Conforme descrito acima, após a indução da lesão e o período de tratamento com 1 mg/mL de indometacina (IndOH) ou indometacina nanoencapsulada (IndOH-NC), os animais foram submetidos ao teste comportamental de Reconhecimento de Objetos. A capacidade dos animais em discriminar objetos novos e familiares foi analisada pelo índice de reconhecimento. Como apresentado na figura 3A, durante a fase de aquisição, os dois objetos (A e A1) foram explorados igualmente por todos os grupos. Buscando avaliar a memória de curta duração, 3h após a fase de aquisição os animais foram submetidos a uma nova sessão utilizando um dos objetos já explorado e um novo objeto. Como apresentado na figura 3B, os animais injetados com A β 1-42 e os animais injetados com A β 1-42 e que receberam o tratamento com IndOH ou com NC exploraram de forma semelhante o objeto familiar (Objeto A) e o novo objeto (Objeto B), indicando dano cognitivo. Esse dano não foi observado nos animais injetados com A β 1-42 e tratados com IndOH-NC (Fig 3B), sugerindo uma melhora na memória de reconhecimento. De maneira semelhante, 24h após a fase de aquisição, uma nova sessão foi iniciada onde o objeto familiar foi mantido (Objeto A) e um novo objeto (Objeto C) foi adicionado. O A β 1-42 induziu uma alteração na capacidade de discriminação dos objetos e somente o tratamento com IndOH-NC foi capaz de reduzir esta alteração na memória de longa duração (Fig 3C).

Nanocápsulas aumentam a biodisponibilidade cerebral da indometacina

Considerando que os animais injetados com A β 1-42 e tratados com IndOH-NC apresentaram melhor performance no teste de reconhecimento de objetos quando comparados aos animais injetados com A β 1-42 e tratados com IndOH, a quantidade de indometacina no tecido cerebral foi analisada por CLAE. Nossos resultados mostraram que o tratamento com IndOH-NC foi capaz de aumentar em 5 vezes a quantidade de indometacina no tecido cerebral em comparação ao tratamento com a mesma dose de IndOH (Fig 4).

Análise da toxicidade causada pelo tratamento com nanocápsulas contendo indometacina

Para verificar se os tratamentos com IndOH-NC e IndOH por 14 dias causaram alguma lesão hepática, foi avaliada a atividade das enzimas hepáticas γ -glutamyltransferase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro. Nenhum dos animais tratados apresentou alteração significativa nas enzimas investigadas, sugerindo que, nestas condições experimentais, nenhuma das formulações causou toxicidade hepática (Tabela 1).

Indometacina nanoencapsulada previne a ativação da JNK induzida pelo A β 1-42

Uma vez que a proteína JNK está envolvida na sobrevivência de diversos tipos celulares, foi avaliado se a neuroproteção mediada pela IndOH-NC poderia envolver esta via. Dessa forma, o imunoconteúdo da JNK, bem como seu nível de fosforilação, foi avaliado após 48h da adição do peptídeo A β 1-42 e do tratamento com IndOH-NC nas culturas organotípicas de hipocampo. Conforme observado na figura 5, o A β 1-42 causou um aumento significativo na fosforilação da JNK quando comparada ao controle. O tratamento com 50 ou 100 μ M de IndOH-NC foi capaz de reduzir este aumento ($p < 0,001$), sem alterar os níveis totais da JNK, sugerindo que ela foi capaz de manter a proteína inativada.

O tratamento com indometacina nanoencapsulada reduz a ativação glial induzida pelo A β 1-42

Considerando que a resposta inflamatória está intimamente ligada a neurodegeneração observada na DA, e que as células gliais parecem desenvolver um papel central na neuroinflamação, foi avaliado o imunoconteúdo da proteína GFAP e da Isolectina B₄, representativos da ativação astrocitária e microglial respectivamente. O A β 1-42 causou um

aumento significativo na ativação dos astrócitos nas culturas organotípicas de hipocampo, como pode ser observado pelo aumento da imunoreatividade da GFAP (Fig. 6A e B). O tratamento com IndOH-NC na concentração de 50 μ M ($p < 0,05$) ou 100 μ M ($p < 0,001$) nas culturas reduziu o aumento do imunoconteúdo da GFAP (Fig. 6A e B). De forma semelhante, no modelo *in vivo*, nossos resultados mostraram que a injeção icv do A β 1-42 também induziu um significativo aumento no imunoconteúdo desta proteína (Fig. 6C e D) e apenas o tratamento com 1mg/Kg de IndOH-NC suprimiu este aumento ($p < 0,05$). Além disso, apenas o tratamento com IndOH-NC foi capaz de reduzir o aumento na reatividade da Isolectina B₄ induzida pelo A β 1-42, sugerindo uma diminuição da ativação microglial (Fig. 7).

Discussão

As doenças neurodegenerativas estão entre os problemas mais enigmáticos da medicina. Dentre estas doenças, a DA apresenta-se como uma das mais complexas, uma vez que a total compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença ainda está longe de ser elucidada. A teoria da cascata amilóide é a mais aceita pelos pesquisadores da DA, ela postula que as mudanças graduais no metabolismo de agregação do peptídeo A β iniciam a cascata de lesões neuronais e inflamatórias que culminam na extensiva disfunção e na morte neuronal associada com déficits nos neurotransmissores e levando à demência (Selkoe, 1991; Hardy and Higgins, 1992).

A eficácia de fármacos no SNC para tratamento de doenças locais é limitada, pois depende da sua capacidade de atravessar a BHE e alcançar concentrações terapêuticas no cérebro após administração sistêmica. Associado a esta limitação, a baixa fração livre da indometacina na circulação sanguínea devido à alta ligação a proteínas plasmáticas, leva a uma baixa biodisponibilidade para o tecido cerebral. Baseado em promissores resultados do nosso grupo de pesquisa onde a IndOH-NC exerceu um potente efeito na neuroinflamação induzida pela isquemia cerebral em um modelo *in vitro* (Bernardi *et al.*, 2010), neste trabalho nós avaliamos seus efeitos em culturas organotípicas expostas ao peptídeo A β 1-42, um modelo *in vitro* da DA já bem

estabelecido em nosso grupo (Hoppe *et al.*, 2010; Frozza *et al.*, 2009; Nassif *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram que a exposição ao A β 1-42 causou uma significativa morte celular após 48h e o tratamento agudo com ambas as concentrações testadas de IndOH-NC reduziu significativamente a morte celular. Entre os possíveis mecanismos que poderiam estar envolvidos nesta neuroproteção, pode-se sugerir que a indometacina poderia alterar a conformação do A β exercendo uma atividade anti-agregante (Thomas *et al.* 2001; Agdeppa *et al.* 2003). Também tem sido proposto que alguns AINEs poderiam interferir na agregação do A β induzindo a expressão de proteínas ligantes amilóides (PLAs), como a transtirretina, envolvida na remoção do A β do SNC (Gasparini *et al.*, 2004).

Com o objetivo de tentar compreender melhor os efeitos da IndOH-NC na DA, nós também investigamos se tratamento poderia atuar na inflamação mediada pelo A β 1-42 no modelo de cultura organotípica de hipocampo. Desta forma, nós avaliamos os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 no meio de cultivo das culturas, uma vez que altos níveis de IL-6 podem afetar a fisiologia de neurônios corticais através da alteração da resposta ao Ca²⁺ pela ativação de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Este efeito pode contribuir com a disfunção cognitiva associada à DA, pois receptores NMDA estão envolvidos em inúmeras funções neuronais, incluindo memória e aprendizagem (Qio and Gruol Donna, 2003). Neste trabalho, demonstramos que o tratamento com 50 ou 100 μ M de IndOH-NC foi capaz de reduzir significativamente a liberação de IL-6 no meio de cultivo das culturas expostas ao A β 1-42, o que poderia explicar, pelo menos em parte, o efeito neuroprotetor observado.

Uma vez que a prevenção do déficit cognitivo decorrente da progressiva neurodegeneração é um dos principais objetivos buscados pelos pesquisadores da DA, nós avaliamos o efeito do tratamento sistêmico com IndOH ou IndOH-NC em modelo *in vivo* da DA através da injeção icv do peptídeo A β 1-42. Para avaliar o dano cognitivo induzido pela injeção icv do A β 1-42 utilizamos o teste comportamental de reconhecimento de objetos (Bevins and Besheer, 2006). Neste teste, avaliamos a memória de curta duração e a de longa duração, com intervalos de retenção de memória de 3 e 24h, respectivamente. O intervalo de retenção é a quantidade de tempo que o animal consegue reter a memória do objeto idêntico apresentado durante a

sessão de treinamento até o teste, onde um objeto familiar é trocado por um novo objeto (Taglialatela *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que os animais injetados com A β e tratados com IndOH-NC apresentaram diferenças significativas nos índices de reconhecimento de ambos os testes, aumentando o tempo de exploração do novo objeto. Por outro lado, o tratamento com IndOH não apresentou diferenças significativas em nenhum dos testes. A resposta farmacológica a um fármaco é diretamente relacionada à sua concentração no sítio de ação requerido. As diferenças observadas entre os tratamentos com IndOH-NC ou IndOH no teste comportamental, nos motivou a avaliar a biodisponibilidade cerebral da indometacina. Nossos resultados mostraram que a quantidade de indometacina no tecido cerebral após os 14 dias de tratamento foi maior para os ratos tratados com IndOH-NC quando comparada aos tratados com IndOH, sugerindo que as nanocápsulas poliméricas aqui utilizadas foram capazes de carrear o fármaco ao tecido cerebral. Os mecanismos pelos quais as nanocápsulas poliméricas atravessam a BHE não são completamente compreendidos. Recentes estudos atribuem um papel central às células endoteliais no processo de adesão das nanocápsulas e subsequente endocitose, transcitose, modulação das junções *tight* ou inibição da glicoproteína P (Fernandes *et al.*, 2010). Além disso, o revestimento da nanocápsula com polissorbato 80 pode resultar em um menor aprisionamento da nanocápsula pelo sistema fagocitário mononuclear e aumentar o tempo de circulação das mesmas (Wilson *et al.*, 2008). De fato, diversos estudos têm mostrado que o revestimento com polissorbato 80 é uma das estratégias para vetorizar fármacos para o SNC (Gulyaev *et al.*, 1999; Bernardi *et al.*, 2009b; Frozza *et al.*, 2010). Todos estes fatores, associados ao fato de que as nanocápsulas poliméricas são capazes de reduzir a ligação entre a indometacina e as proteínas do soro, provavelmente contribuíram para o direcionamento do fármaco até tecido cerebral, como observado em nossos resultados. Além disso, através da atividade das enzimas hepáticas, podemos observar que nenhum dos tratamentos causou toxicidade hepática.

Objetivando compreender os mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor da indometacina, nós avaliamos a atividade de proteínas envolvidas na fisiopatologia da DA, tais como a c-Jun-N-terminal cinase (JNK), uma das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), a qual apresenta-

se superexpressa em cérebros com DA (Zhu *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2004). Sabe-se também que a ativação JNK está envolvida na transcrição de genes que desempenham um papel na morte neuronal associada a doenças neurodegenerativas (Bendoti *et al.*, 2006), como os genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias (Waetzig *et al.*, 2005) e os que ocupam um papel central na apoptose neuronal mediada por caspases (Weston and Davis, 2007). Além disso, na DA a ativação da JNK está associada à neurodegeneração induzida pela *tau* (Yoshida *et al.*, 2004). Nossos resultados mostraram que o tratamento com IndOH-NC nas culturas organotípicas foi capaz de reduzir significativamente a fosforilação da JNK, diminuindo desta forma a sua ativação, confirmando que a diminuição da neuroinflamação pode ser um dos mecanismos neuroprotetores da indometacina.

Para avaliar outros possíveis mecanismos moleculares envolvidos no efeito neuroprotetor da IndOH-NC frente a neurotoxicidade induzida pelo A β 1-42, principalmente associada à neuroinflamação, nós avaliamos a imunoreatividade do marcador glial de inflamação, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Panter *et al.*, 1985) nas culturas organotípicas e no modelo *in vivo* da DA. Um dos mais conhecidos indutores da ativação glial é a disfunção neuronal e a injúria, entretanto esta ativação é transitória e reversível (Kereutzberg, 1996). Em algumas doenças, tais como a DA, as células gliais permanecem em um estado crônico de ativação (Hu *et al.*, 1998), principalmente na proximidade das placas senis (Pike *et al.*, 1995). Após ativação pelo estímulo inflamatório, a microglia migra até o local da injúria e morfológicamente transforma-se em um macrófago. Esta transformação é acompanhada por uma super-regulação de moléculas de superfície das células envolvidas na responsividade imunológica, bem como na indução da liberação de citocinas inflamatórias (Kalara, 1999). Um fato importante que deve ser ressaltado em nossos resultados é que a IndOH-NC foi capaz de causar um significativo decréscimo no imunoconteúdo da proteína GFAP em ambos os modelos da DA. Além disso, o tratamento com IndOH-NC reduziu a ativação microglial, como pode ser observado pela diminuição da reatividade da Isolectina B₄ nos ratos submetidos a injeção do A β .

Embora mais estudos sejam necessários, os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a redução da neuroinflamação está envolvida

no efeito neuroprotetor da indometacina nanoencapsulada. Para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho demonstrando o efeito neuroprotetor da indometacina em nanocápsulas em modelos da Doença de Alzheimer. Embora a indometacina não seja utilizada na terapia da DA, nossos resultados sugerem que este fármaco, quando nanoencapsulado, poderia ser um potencial candidato para o tratamento desta patologia.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelas agências brasileiras: CAPES, CNPq, Rede Brasil-França CNPq/MCT, FINEP, Rede Nanocosméticos/CNPq-MCT.

Referências

Agdeppa ED, Kepe V, Petric A, et al. In vitro detection of (S)-naproxen and ibuprofen binding to plaques in the Alzheimer's brain using the positron emission tomography molecular imaging probe 2-(1-{6[(2-[¹⁸F]fluoroethyl)(methyl)amino]-2-naphtyl} fcethylidene) malono nitrile. *Neuroscience* 2003; 117: 723–730.

Ammoury N, Fessi H, Devissaguet JP, et al. Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Pharm Res* 1991; 8:101-5.

Barratt GM. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm Sci Technol Today* 2000;3:163-71.

Bendotti C, Tortarolo M, Borsello T. Targeting stress activated protein kinases, JNK and p38, as new therapeutic approach for neurodegenerative diseases. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2006; 6:1–9.

Bernardi A, Zilberstein ACCV, Jäger E, Campos MM, Morrone FB, Calixto JB, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AMO. Effects of indomethacin-loaded

nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. *British J Pharmacol* 2009a; 158:1104-1111.

Bernardi A, Braganhol E, Jäeger E, et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters* 2009b; 281: 53-63.

Bernardi A, Frozza RL, Horn AP, et al. Protective effects of indomethacin-loaded nanocapsules against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of neuroinflammation. *Neurochem Int* 2010; 57:629-636

Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 2006;1:1306-11.

Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 2005;76:77-98.

Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol* 2006;57 Suppl 5:113-24.

Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. New York: The McGraw-Hill; 2008.

Burian M, Geisslinger G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol Ther* 2005;107:139-54.

Chaubal MV. Application of drug delivery technologies in lead candidate selection and optimization. *Drug Discov Today* 2004;9:603-9.

Fernandes C, Soni U, Patravale V. Nano-interventions for neurodegenerative disorders. *Pharmacol Res* 2010;62:166-78.

Frozza RL, Horn AP, Hoppe JB, et al. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res* 2009;34:295-303.

Frozza RL, Bernardi A, Paese K, et al. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *J Biomed Nanotechnol* 2010;6:694-703.

Gasparini L, Ongini E, Wenke G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *J Neurochem* 2004; 91: 521-536.

Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN, Antropov AS, Kivman GY, Kreuter J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm Res* 1999;16:1564-9.

Guterres SS, Muller CB, Michalowski CB, et al. Gastro-intestinal tolerance after oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *STP Pharm Sci*; 11:229-233

Hailer NP, Vogt C, Korf HW, Dehghani F. Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 2005;21:2347-60.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256:184-5.

Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2010;117:919-47.

Hoppe JB, Frozza RL, Horn AP, et al. Amyloid- β neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3 β , *tau* and neuroinflammation. *J Pineal Res* 2010; 48:230-8.

Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* 1998;785:195-206.

van 't Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2001;345:1515-21.

Ittner LM, Gotz J. Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2011;12:65-72.

Jager E, Venturini CG, Poletto FS, et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:130-40.

Kalaria RN. Microglia and Alzheimer's disease. *Curr Opin Hematol* 1999;6:15-24.

Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 2005;1754:253-62.

Kin SY, Lee YM, Shin HJ, et al. Indomethacin-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymeric nanosphere: pharmacokinetic characteristics of indomethacin in the normal Sprague-Dawley. *Biomaterial* 2001; 22:2049-2056.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;19:312-8.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:499-509.

Legrand P, Barratt G, Mosqueira V, et al. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. *S T P Pharm Sci*. 1999; 9:411-18.

Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010;385:113-42.

Nassif M, Hoppe J, Santin K, et al. Beta-amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3beta, and PTEN. *Neurochem Int* 2007;50:229-35.

Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc* 1999;3:278-90.

Panter SS, McSwigan JD, Sheppard JR, Emory CR, Frey WH, 2nd. Glial fibrillary acidic protein and Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 1985;10:1567-76.

Parepally JM, Mandula H, Smith QR. Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin. *Pharm Res* 2006;23:873-81.

Patrignani P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, COX-2 and colorectal cancer. *Toxicol Lett* 2000;112-113:493-8.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press 1982.

Perini R, Fiorucci S, Wallace JL. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury and repair: a window of opportunity for cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donors. *Can J Gastroenterol* 2004;18:229-36.

Peterson GL. Determination of total protein. *Meth Enzym* 1983; 91:95-119.

Philipson O, Lord A, Gumucio A, O'Callaghan P, Lannfelt L, Nilsson LN. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *Febs J* 2010;277:1389-409.

Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1995;132:172-9.

Pohlmann AR, Soares LU, Cruz L, et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Curr Drug Deliv* 2004; 1:103-110.

Pohlmann AR, Weiss V, Mertins O, et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *Eur J Pharm Sci* 2002; 16:305-312.

Qiu Z, Gruol Donna L. Interleukin-6, β -amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *J Neuroimmunol* 2003; 139:51-7.

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010;362:329-44.

Reynolds JEF. Martindale The Extra Pharmacopeia. 40 ed. Londres Pharmaceutical Press; 1993.

Sakono M, Zako T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *Febs J* 2010;277:1348-58.

Sastre M, Walter J, Gentleman SM. Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *J Neuroinflammation* 2008;5:25.

Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1991;6:487-98.

Stopinni L, Buchs PA, Muller DA. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Method* 1991; 37:173-182.

Streit WJ, Kreutzberg GW. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* 1987;16:249-60.

Tagliatela G, Hogan D, Zhang WR, Dineley KT. Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behav Brain Res* 2009;200:95-9.

Thomas T, Nadackal GT, Thomas K. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit amyloid- β aggregation. *Neuropharmacol Neurotoxicol* 2001; 12: 3263-7.

US Alzheimer's Association, 2011 Alzheimer's Disease Facts and Figures, *Alzheimer's & Dementia* 2011; 7: 208-244.

Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, et al. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* 2005;50:235-46.

Weggen S, Eriksen JL, Das P, et al. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 2001;414:212-6.

Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, et al. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 2003;278:31831-7.

Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:142-9.

Wilson B, Samanta MK, Santhi K, et al. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the target delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2008; 1200: 159-168.

Yoshida H, Hastie CJ, McLauchlan H, Cohen P, Goedert M. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* 2004;90:352-8.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 2011;4:3.

Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, et al. Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2001;76:435-41.

Legendas das figuras

Fig. 1. Indometacina nanoencapsulada (IndOH-NC) diminui a lesão celular após exposição de culturas organotípicas ao peptídeo A β 1-42. (A) Imagens representativas da incorporação do IP nas culturas organotípicas após 48h de exposição a 2 μ M do A β 1-42 e tratadas com 50 ou 100 μ M de IndOH-NC. (B) Quantificação da incorporação do IP em resposta ao A β e aos tratamentos com IndOH-NC. Valores estão expressos como percentual de morte celular nos hipocampos. Barras representam Média \pm DP, n=6. #Diferença significativa em relação às culturas controles. ***Diferença significativa em relação à cultura exposta ao A β 1-42. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, p<0,001).

Fig. 2. Quantificação da liberação de IL-6 no meio de cultivo 48h após adição do A β 1-42 em culturas organotípicas tratadas ou não com indometacina nanoencapsulada. Barras representam Média \pm DP, n=3. #Significativamente diferente de todos os grupos. ***Significativamente diferente em relação às culturas expostas ao A β 1-42. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, p<0,001).

Fig. 3. Avaliação do déficit cognitivo induzido pela injeção icv do peptídeo A β 1-42 em animais tratados ou não com indometacina em solução ou indometacina nanoencapsulada. (A) Histograma representativo dos índices de reconhecimento dos objetos idênticos (Objeto A e A1) no treinamento dos ratos 14 dias após injeção do A β 1-42 e tratados com 1mg/Kg de IndOH-NC ou IndOH. p>0,05. (B) Histograma representativo dos índices de reconhecimento do objeto familiar (Objeto A) e do novo objeto (Objeto B) no teste da memória de curta duração realizado 3h após o treinamento. ***Significativamente diferente entre o índice de reconhecimento do objeto familiar e o objeto novo (p<0,001). (C) Histograma representativo dos índices de reconhecimento do

objeto familiar (Objeto A) e do objeto novo (Objeto C) no teste da memória de longa duração realizado 24h após o treinamento. Significativamente diferente entre o índice de reconhecimento do objeto familiar e do objeto novo (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Barras representam Média \pm DP, $n=4$ a 7 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

Fig. 4. Quantificação da indometacina no tecido cerebral. Quantificação do fármaco no tecido cerebral dos animais tratados com 1mg/Kg (i.p.) de indometacina (IndOH) ou indometacina nanoencapsulada (IndOH-NC) após 14 dias de tratamento. Barras representam Média \pm DP, $n=4$ a 7 animais por grupo. Os dados foram analisados pelo teste t de Student. ***Significativamente diferente dos animais tratados com IndOH ($p < 0,001$).

Fig. 5. Efeito do tratamento com indometacina nanoencapsulada (IndOH-NC) na fosforilação da JNK em cultura organotípica de hipocampo. (A) *Western Blotting* representativo do imunoconteúdo da JNK fosforilada, JNK e β -actina 48h após a exposição ao $A\beta 1-42$ e tratamentos com IndOH-NC. (B) Histogramas representativos da relação fosfo-JNK/JNK. Valores foram normalizados em relação ao respectivo controle (100%). Barras representam Média \pm DP. #Significativamente diferentes de todos os grupos, $p < 0,001$. ***Significativamente diferente da cultura exposta ao $A\beta 1-42$, $p < 0,001$. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

Fig. 6. Avaliação da ativação astrogliar pelo $A\beta 1-42$ com e sem tratamentos com indometacina (IndOH) e indometacina nanoencapsulada (IndOH-NC). (A) *Western Blotting* representativo do imunoconteúdo da GFAP e da β -actina 48h após exposição da cultura organotípica ao $A\beta 1-42$ e aos tratamentos com IndOH-NC. (B) Histogramas representativos da análise quantitativa do imunoconteúdo da GFAP após exposição da cultura organotípica ao $A\beta 1-42$ e aos tratamentos com 50 ou 100 μ M de IndOH-NC. Barras representam Média \pm DP, $n=6$. #Significativamente diferente de todos os

grupos.*Significativamente diferente da cultura exposta ao A β 1-42, p<0,05. ***Significativamente diferente da cultura exposta ao A β 1-42, p<0,001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). (C) *Western Blotting* representativo do imunoconteúdo da GFAP e da β -actina após 14 dias da injeção icv do peptídeo A β 1-42 e dos tratamentos com 1mg/Kg de IndOH-NC ou IndOH. (D) Histogramas representativos do imunoconteúdo da GFAP após injeção icv do A β 1-42 e dos tratamentos com IndOH-NC ou IndOH. Barras representam Média \pm DP, n=4 a 7. #Significativamente diferente de todos os grupos.*Significativamente diferente do grupo A β 1-42, p<0,05. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

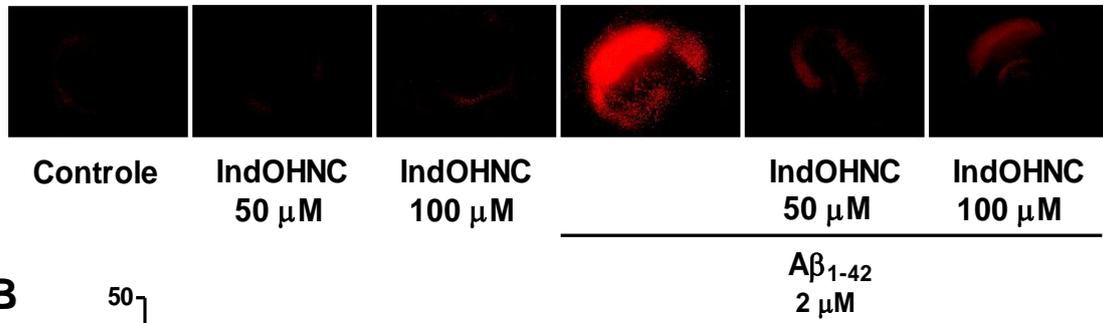
Fig. 7. Efeito do tratamento com indometacina nanoencapsulada (IndOH-NC) ou indometacina em solução (IndOH) na reatividade da Isolectina B₄. Imagem representativa da reatividade da Isolectina B₄ (120KDa) 14 dias após a injeção icv do A β 1-42 e do tratamento com 1mg/Kg de IndOH-NC ou IndOH. Os resultados são representativos de 3 a 5 animais por grupo.

Tabela 1**Dosagem sérica de enzimas hepáticas**

	AST (U/L) (TGO)	Ref 20-42	ALT (U/L) (TGP)	Ref 39-84	GGT (U/L)
IndOH 1 mg/kg	104±16		42±8		3.5±1.2
IndOH-NC 1 mg/kg	119±11		49±11		3.5±0.7
Aβ+IndOH 1 mg/kg	114±15		49±5		4±1.4
Aβ+IndOH-NC 1 mg/kg	99±13		43±16		3±0.8

Figura 1

A



B

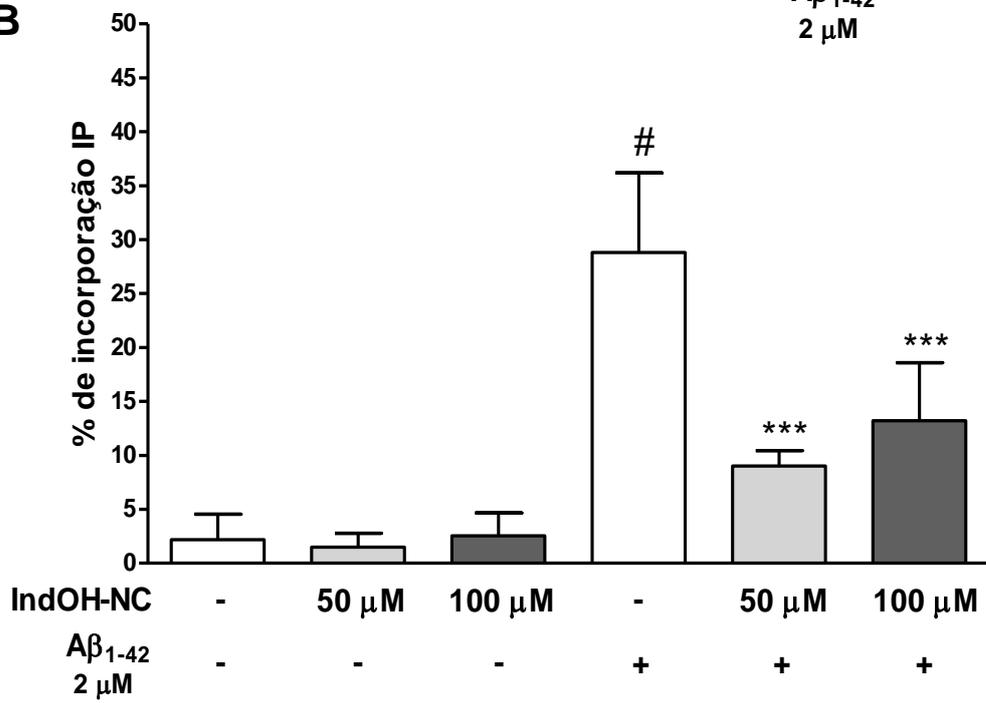


Figura 2

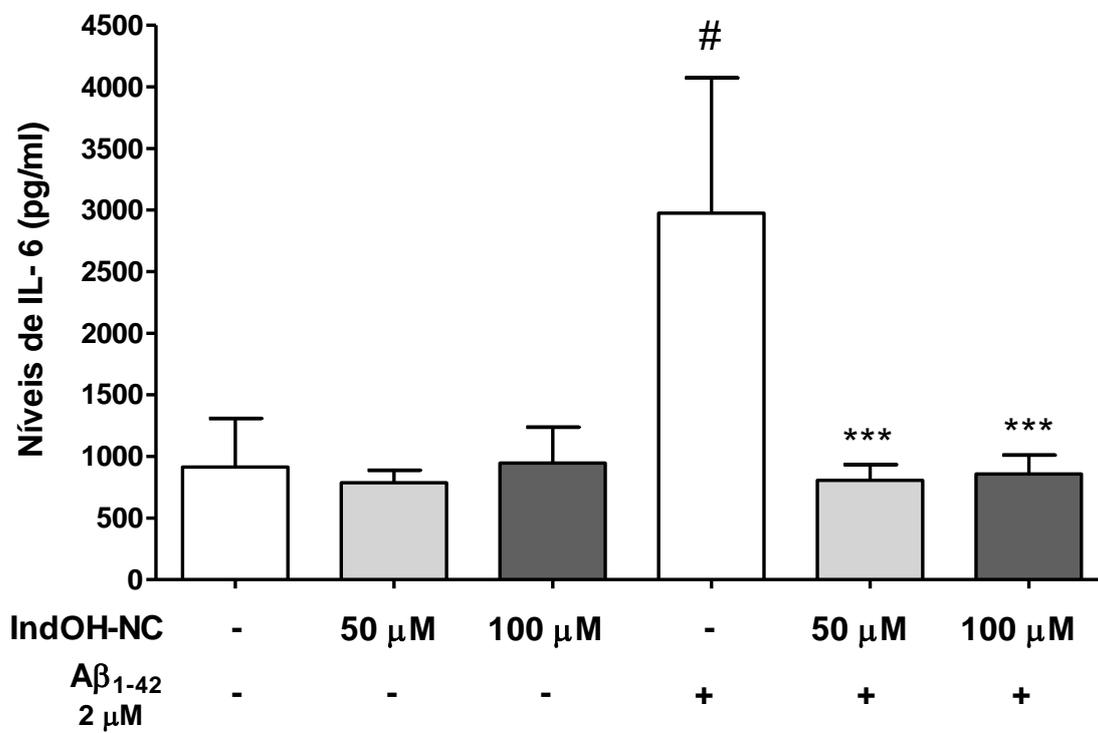
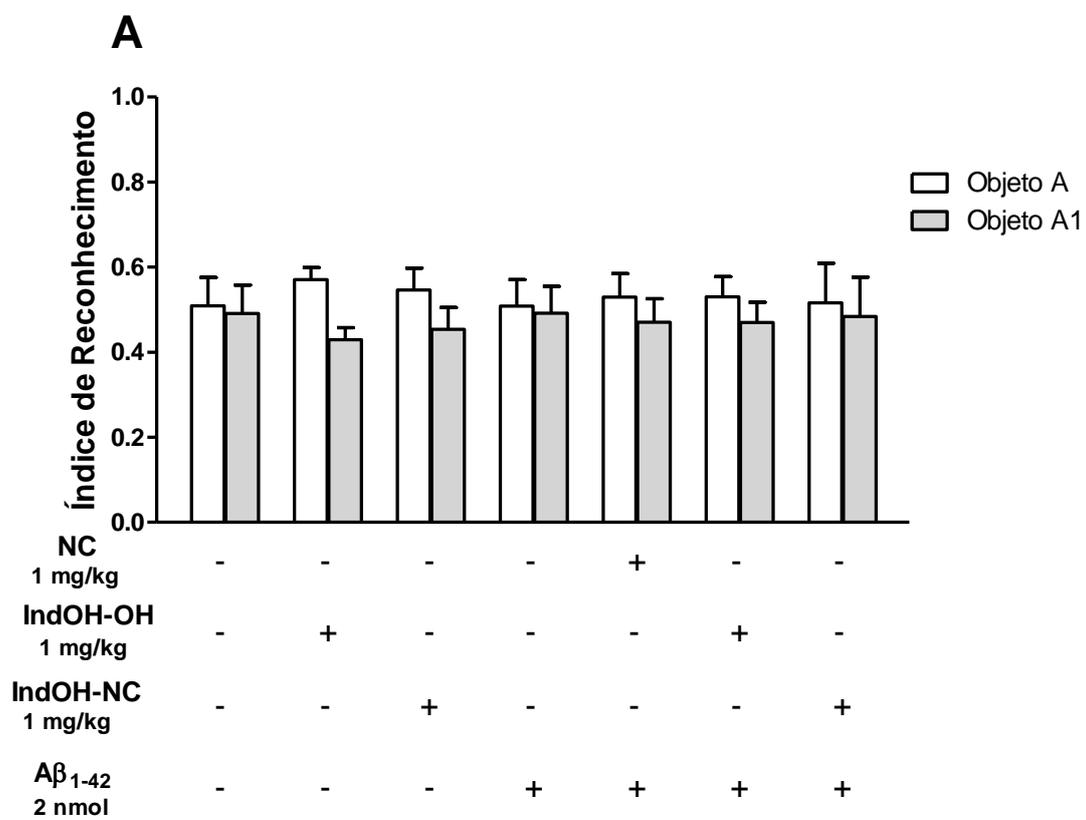
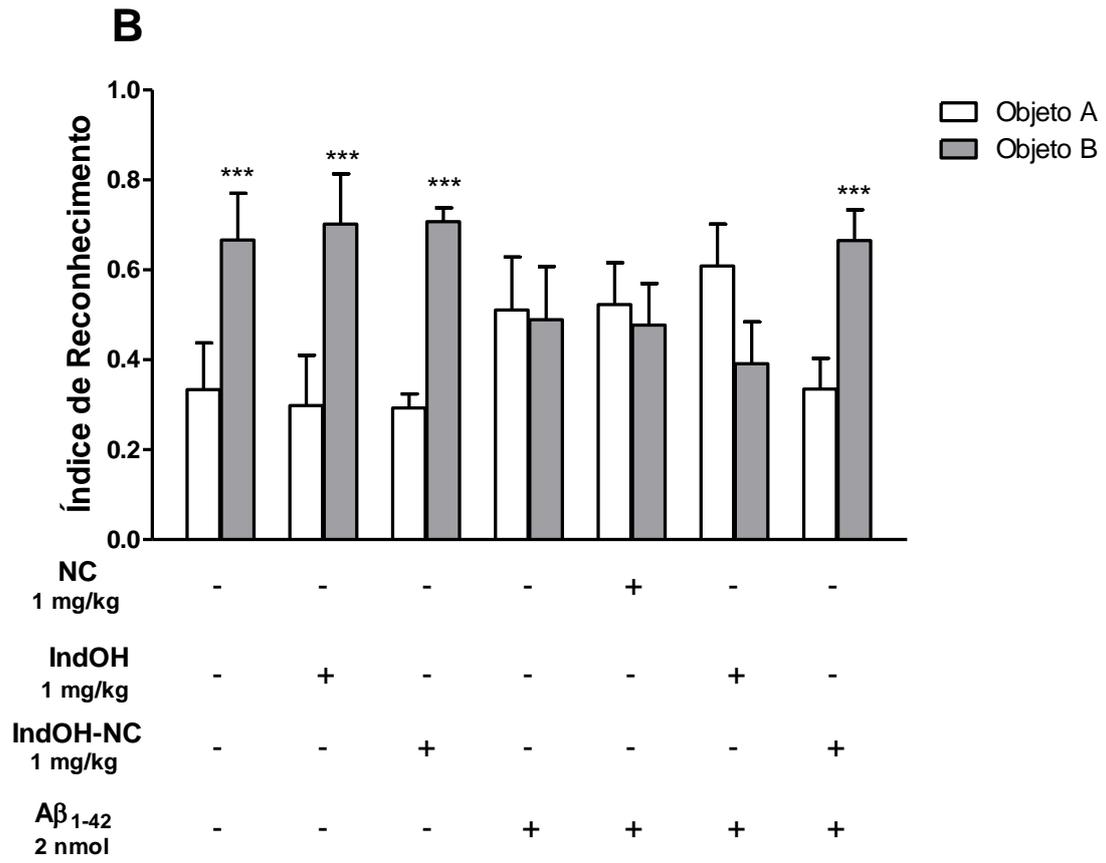


Figura 3





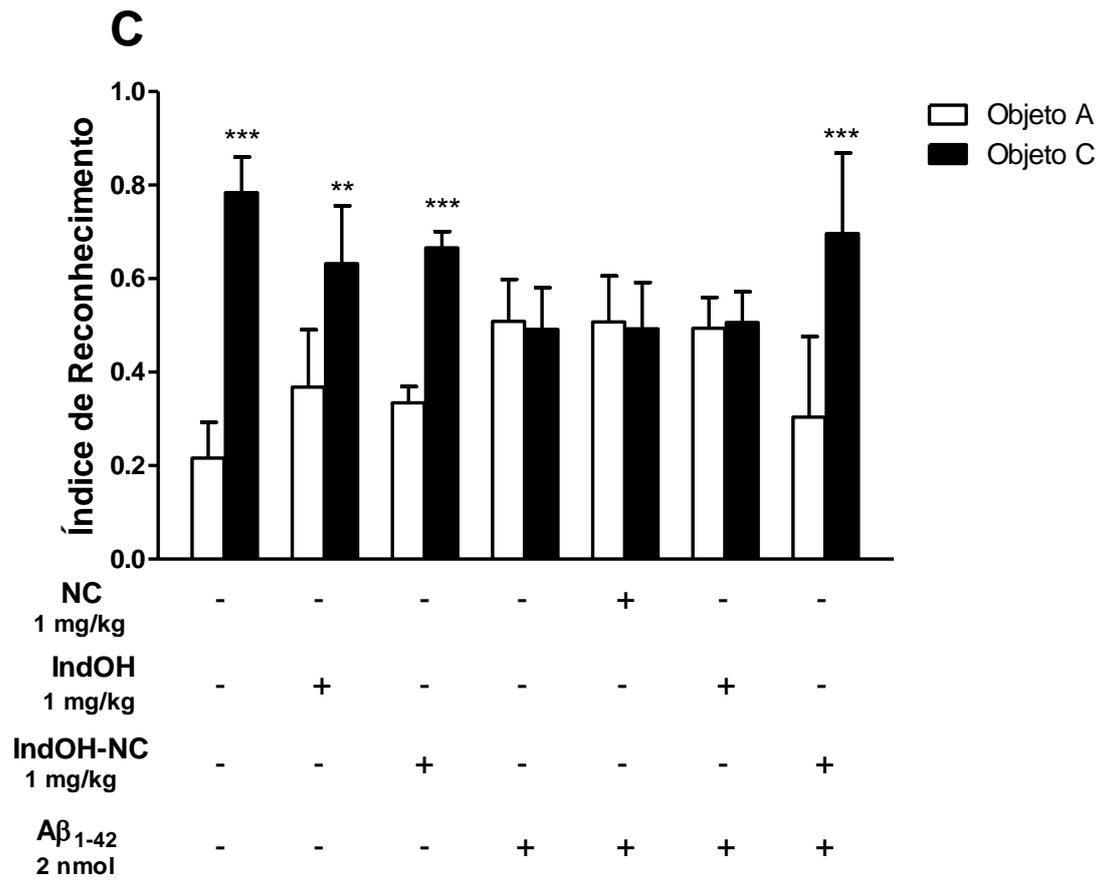


Figura 4

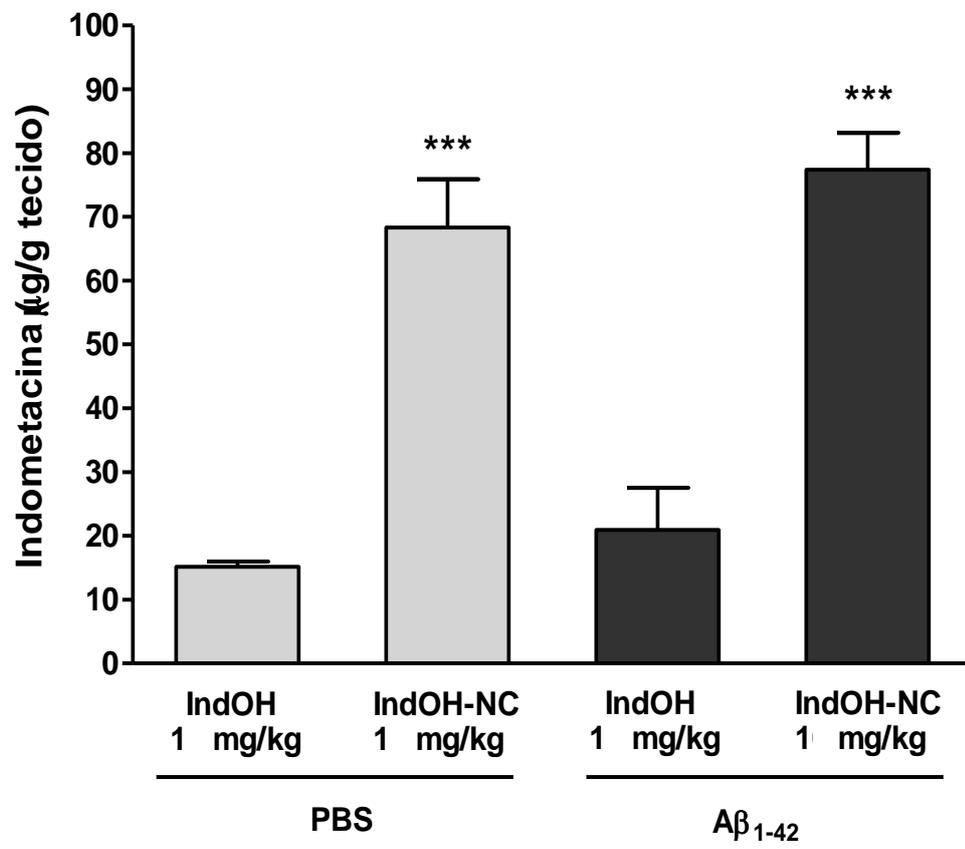
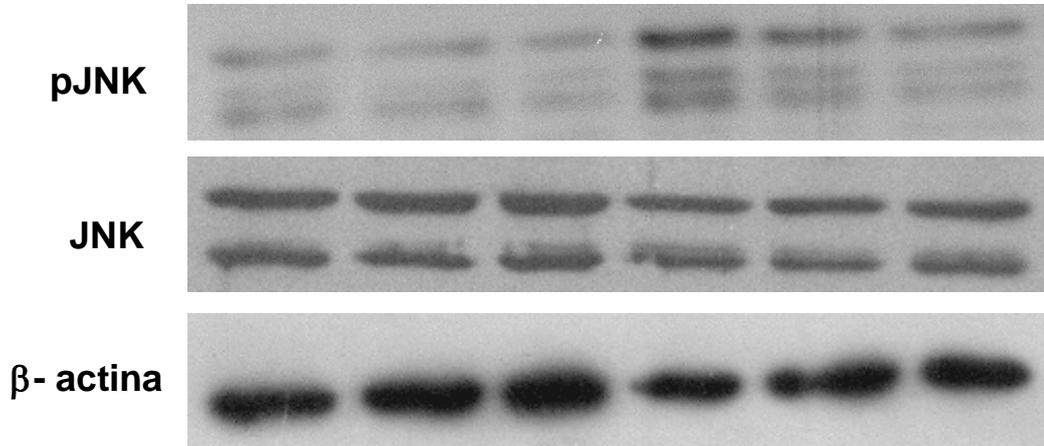


Figura 5

A



B

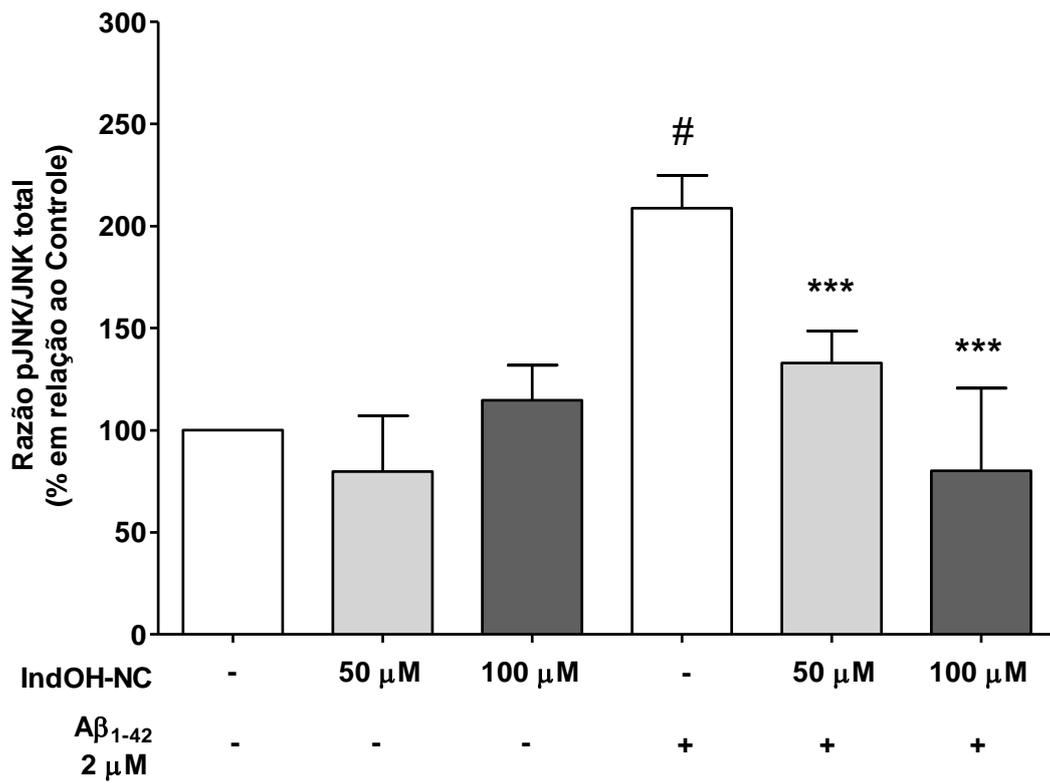
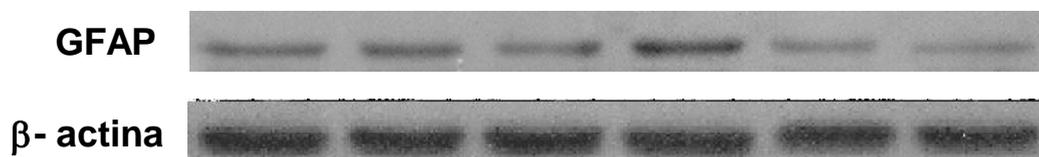
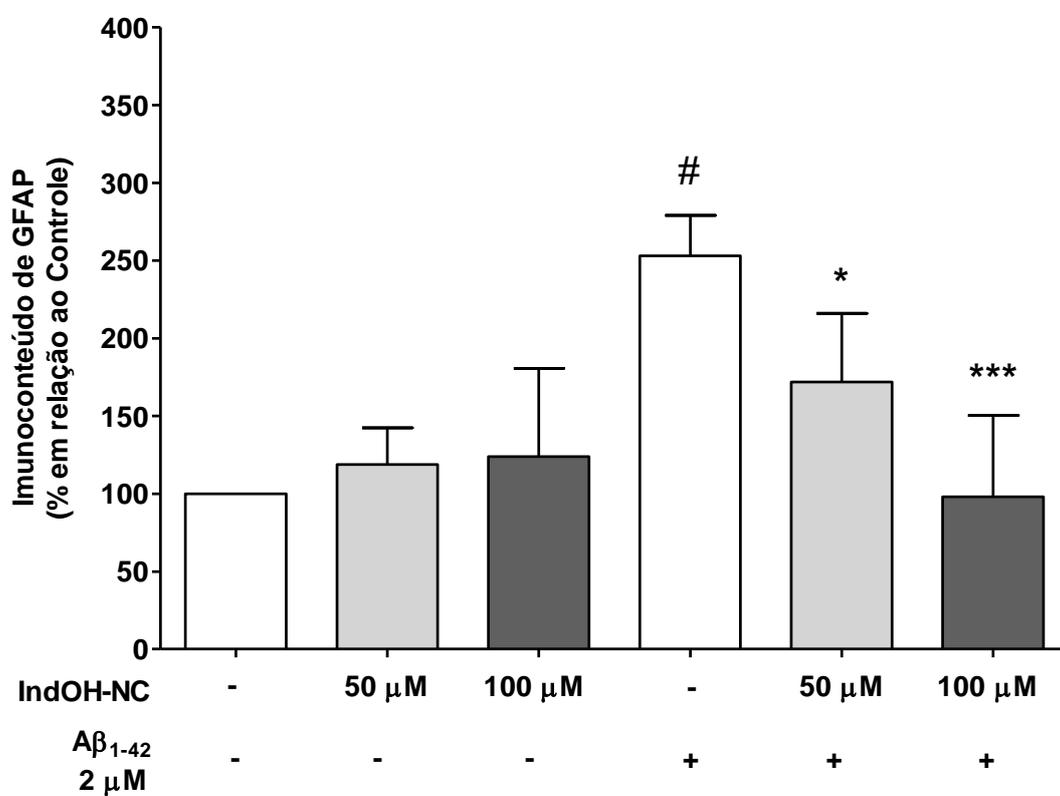


Figura 6

A



B



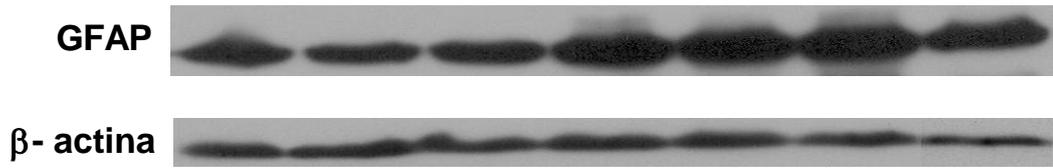
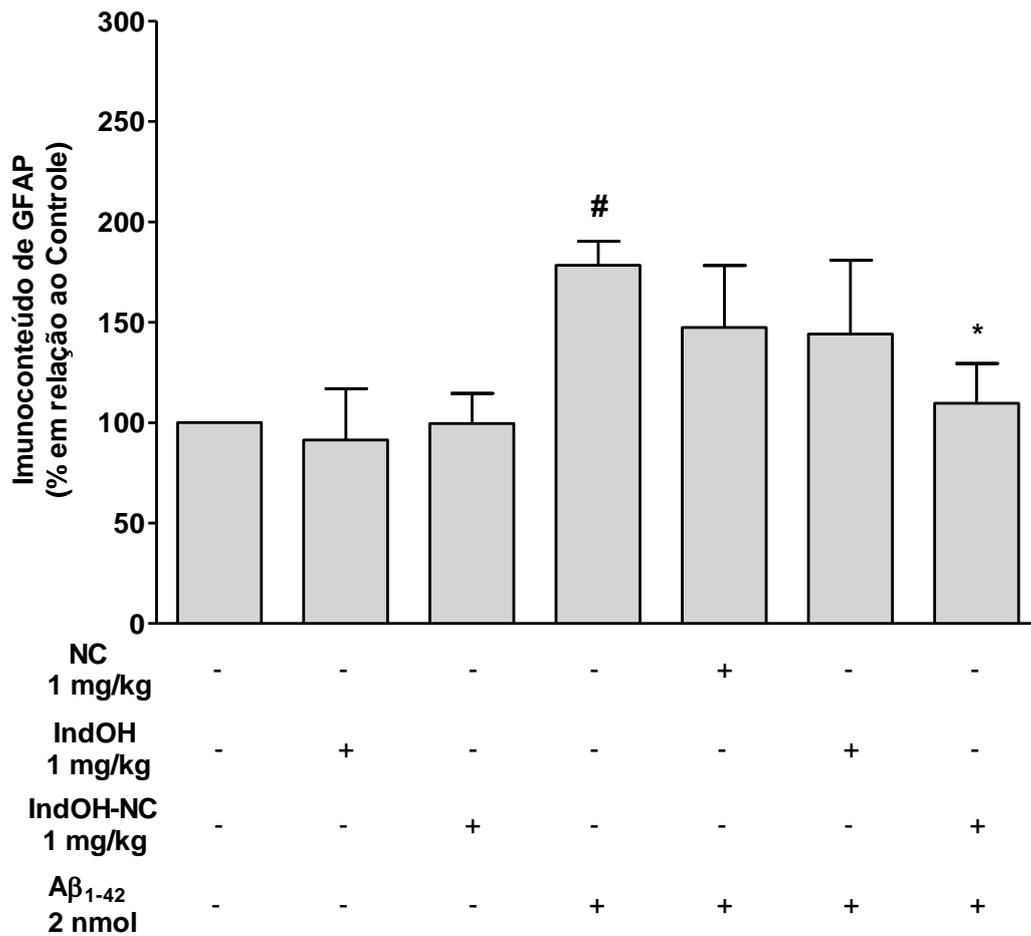
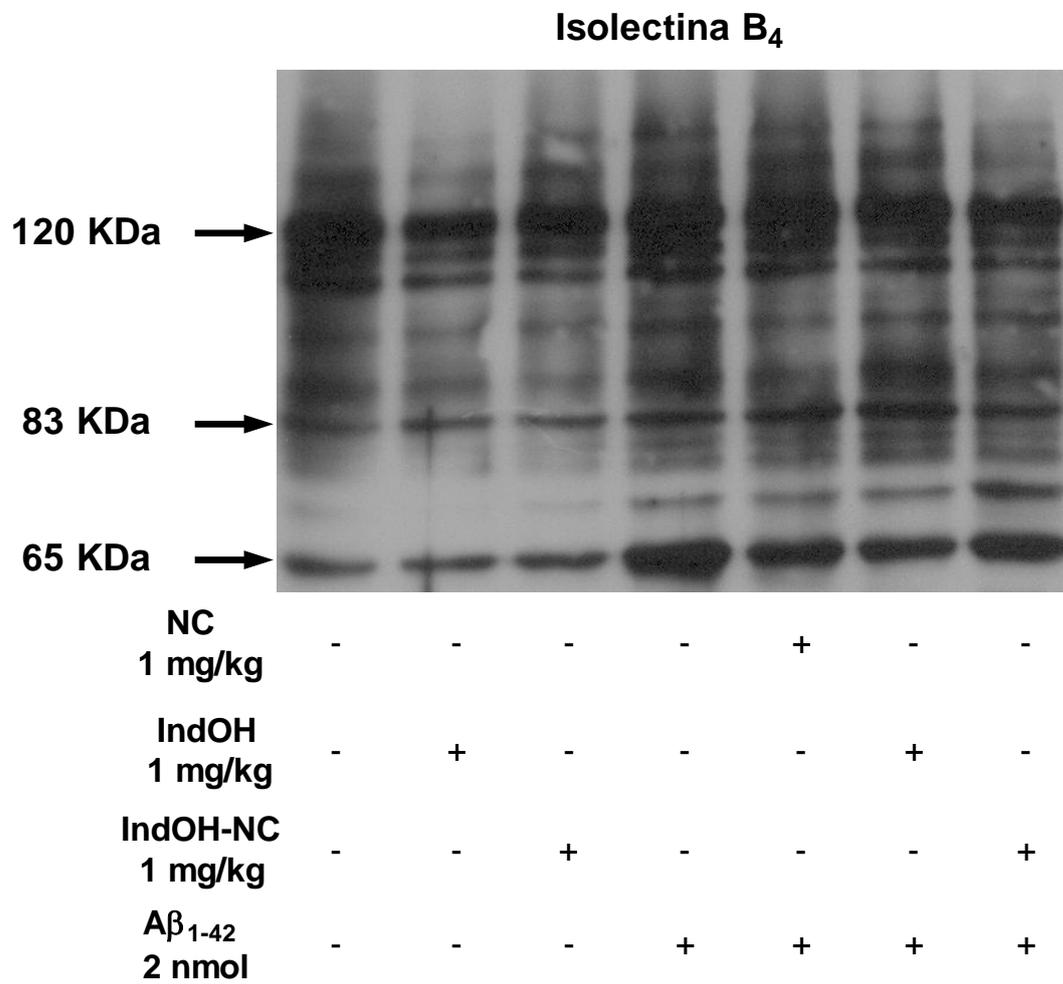
C**D**

Figura 7



Anexo