

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DE UM MODULADOR
ALOSTÉRICO POSITIVO DO MGLUR5 EM MODELO DE TOXICIDADE INDUZIDA
POR AMILOIDE-BETA E EM MODELO MURINO TRANSGÊNICO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER**

PAULA MARIA QUAGLIO BELLOZI

BELO HORIZONTE

2018

PAULA MARIA QUAGLIO BELLOZI

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DE UM MODULADOR
ALOSTÉRICO POSITIVO DO MGLUR5 EM MODELO DE TOXICIDADE INDUZIDA
POR AMILOIDE-BETA E EM MODELO MURINO TRANSGÊNICO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Coorientadora: Prof. Dra. Fabíola Mara Ribeiro

BELO HORIZONTE

2018

043

Bellozi, Paula Maria Quaglio.

Investigação dos efeitos protetores de um modulador alostérico positivo do mGluR5 em modelo de toxicidade induzida por amiloide-beta e em modelo murino transgênico de doença de Alzheimer [manuscrito] / Paula Maria Quaglio Bellozi. - 2018.

123 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. Coorientadora: Prof.^a. Dra. Fabíola Mara Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Fisiologia - Teses. 2. Farmacologia - Teses. 3. Doença de Alzheimer. 4. Degeneração Neural. 5. Inflamação Neurogênica. 6. Receptor de Glutamato Metabotrópico 5. I. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. II. Ribeiro, Fabíola Mara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

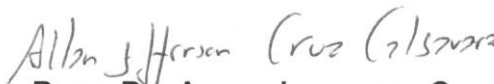
CDU: 612:615

**"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DE UM MODULADOR
ALOSTÉRICO POSITIVO DO MGLUR5 EM MODELO DE TOXICIDADE
INDUZIDA POR AMILOIDE-BETA E EM MODELO MURINO
TRANSGÊNICO DE DOENÇA DE ALZHEIMER"**

PAULA MARIA QUAGLIO BELLOZI


Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 16 de agosto de 2018, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DR. LISIANE DE OLIVEIRA PORCIÚNCULA
UFRGS


PROF. DR. ALLAN JEFFERSON CRUZ CALSAVARA
ESCOLA DE MEDICINA/UFOP


PROFA. DRª. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. PAULO CARAMELLI
FACULDADE DE MEDICINA/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DRª. FABÍOLA MARA RIBEIRO
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COORIENTADORA


PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 16 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelos caminhos que escolho.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, por ter sido meu mentor desde o mestrado, contribuindo de forma única para minha formação.

Aos professores Dr. Helton José Reis e Dra. Luciene Bruno Vieira, pelo acolhimento no laboratório de Neurofarmacologia.

À professora Dra. Fabíola Mara Ribeiro, pela coorientação e colaboração nesta tese.

Ao professor Dr. Tony Wyss-Coray e ao Wyss-Coray Lab, especialmente à Liana, pela oportunidade oferecida para realização do meu estágio sanduíche, onde tive aprendizado único e inspiração para minha carreira.

Aos professores Dr. Antônio Lúcio Teixeira, Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas e Dra. Claudia Natália Ferreira e seus laboratórios; à Dra. Érica Leandro Marciano Vieira e ao Dr. Rafael Pinto Vieira pelas colaborações que tornaram possível a realização de vários experimentos de minha tese.

Aos Laboratórios de Neuropsicofarmacologia, Neurobioquímica, Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Laboratório de Síntese Orgânica, ao Setor de Patologia Clínica do COLTEC e ao CAPI, pela estrutura oferecida para realização de experimentos de minha tese.

A todos os colaboradores da UFMG e de outras universidades, pelas parcerias.

Aos amigos do laboratório de Neurofarmacologia, em especial à Isabel, à Carla, ao Giovanni, à Carol, ao Léo e ao Wellerson pela convivência, paciência e auxílio ao longo desses anos, pela colaboração na minha tese e por terem tornado meus dias de doutorado mais leves.

Aos técnicos e aos amigos do departamento de Farmacologia e do ICB, pelos momentos compartilhados.

À banca examinadora, por se disponibilizar para avaliação de meu trabalho.

Ao meu pai, pelo amor, exemplo, suporte e presença.

À minha mãe, pelo amor, amizade e por sempre procurar uma solução para meus problemas.

Ao Hugo, meu amor, que sempre esteve do meu lado, mesmo que à distância, me dando força e compartilhando comigo meus sonhos.

E às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pela concessão de bolsas e auxílio financeiro.

"Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Dalai Lama

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – EDITAL
01/2015 - DEMANDA UNIVERSAL - Processo CBB - APQ-02044-15;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Universal
01/2016 - Processo: 424588/2016-1.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é o distúrbio neurodegenerativo com maior incidência no mundo. O papel dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) na morte neuronal, que é observada na DA, não é completamente compreendido. Dados recentes indicam que o CDPPB, um modulador alostérico positivo de mGluR5, tem efeitos neuroprotetores em outras patologias do sistema nervoso central. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do tratamento com CDPPB em alterações patológicas induzidas por amiloide- β ($A\beta$) e em um modelo murino de DA. O peptídeo $A\beta$ induziu morte em culturas de neurônios hipocâmpais preparadas a partir camundongos C57Bl/6 recém-nascidos, o que foi prevenido pelo CDPPB (1 nM). Camundongos C57Bl/6 machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção unilateral intra-hipocâmpal de $A\beta$, que induziu déficit de memória na tarefa de reconhecimento de objetos e no medo condicionado ao contexto; bem como neurodegeneração. O tratamento dos animais com CDPPB durante 8 dias (1 ou 5 mg/Kg, i.p.), começando no mesmo dia da cirurgia ou após 1 semana, foi capaz de reverter os déficits cognitivos, a neurodegeneração, e aumentar os níveis de BDNF hipocâmpal. Camundongos transgênicos Thy1-APP^{Lond/Swe} (T41) com 14 meses de idade apresentaram déficits cognitivos e alterações comportamentais, redução da viabilidade neuronal, gliose e acúmulo de $A\beta$. O tratamento com CDPPB (5mg / Kg, i.p.) por 28 dias não foi capaz de reverter o déficit cognitivo. No entanto, o CDPPB aumentou a viabilidade neuronal e reduziu parcialmente a gliose, sem induzir hepatotoxicidade. Assim, apesar de não prevenir a perda de memória em camundongos transgênicos, o CDPPB melhorou a cognição após a injeção de $A\beta$, e tem um potencial efeito neuroprotetor, associado especialmente à prevenção da perda neuronal, devendo ser considerada a avaliação adicional em estudos mais crônicos.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Alzheimer, mGluR5, CDPPB, neurodegeneração, neuroinflamação.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most incident neurodegenerative disorder. The role of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in neuronal cell death observed in AD is not completely understood. Recent data indicates that CDPPB, a positive allosteric modulator of mGluR5, has neuroprotective effects in other central nervous system pathologies. Thus, the present work aimed to investigate the effect of CDPPB treatment in amyloid- β (A β) induced pathological alterations and in an AD mouse model. A β induced cell death in cultures of hippocampal neurons prepared from newborn C57Bl/6 mice, which was prevented by CDPPB (1nM). Male C57Bl/6 mice underwent stereotaxic surgery for unilateral intra-hippocampal A β injection, which induced memory deficit in the object recognition task and contextual conditioned fear, as well as neurodegeneration. Treatment with CDPPB for 8 days (1 or 5 mg / kg, i.p.), starting either on the same day of surgery or after 1 week, was able to reverse cognitive deficits, neurodegeneration, and to increase BDNF hippocampal levels. Thy1-APP^{Lond/Swe} (T41) transgenic mice at 14 months of age presented cognitive deficits and behavioral changes, reduction of neuronal viability, gliosis and A β accumulation. Treatment with CDPPB (5mg / kg, i.p.) for 28 days was not able to reverse cognitive deficit. However, CDPPB increased neuronal viability and partially reduced gliosis without inducing hepatotoxicity. Thus, despite not preventing memory loss in transgenic mice, CDPPB improved cognition after A β injection, and has a potential neuroprotective effect, especially associated with the prevention of neuronal loss. Therefore, it should be considered additional evaluations of the drug in more chronic studies.

KEYWORDS: Alzheimer's Disease, mGluR5, CDPPB, neurodegeneration, neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de A β e tau.	22
Figura 2. Mecanismos de disfunção sináptica na DA.	25
Figura 3. O círculo vicioso que leva à neuroinflamação, perda de LTP e degeneração neuronal durante a DA.	27
Figura 4. Representação esquemática dos potenciais alvos celulares para prevenir ou retardar a progressão da DA.	30
Figura 5. Representação esquemática de mGluRs na sinapse.	32
Figura 6. Vias de sinalização celular ativadas pelo receptor mGlu5.	34
Figura 7. Organização estrutural de mGluRs e estruturas cristalinas dos sítios de ligação isolados.	35
Figura 8. Estrutura química do CDPPB.	37
Figura 9. Espectro de hidrogênio de ¹ H do CDPPB.	57
Figura 10. Espectro de carbono de ¹³ C do CDPPB.	58
Figura 11. Efeito do CDPPB sobre a morte neuronal induzida por A β 1-42 em culturas de neurônios hipocampais.	59
Figura 12. Fosforilação de ERK 1, 2 em cultura de neurônios hipocampais tratadas com CDPPB e A β	60
Figura 13. Fosforilação de AKT em cultura de neurônios hipocampais tratadas com CDPPB e A β	61
Figura 14. Fosforilação de p38 em cultura de neurônios hipocampais tratadas com CDPPB e A β	61
Figura 15. Expressão de fosfo-FoxO3a em cultura de neurônios hipocampais tratadas com CDPPB e A β	62
Figura 16. Expressão de BAX em cultura de neurônios hipocampais tratadas com CDPPB e A β	62
Figura 17. Massa corporal dos animais submetidos à cirurgia para injeção de A β e tratados por 8 dias, com início do tratamento no dia da cirurgia.	63
Figura 18. Massa corporal dos animais submetidos à cirurgia para injeção de A β e tratados por 8 dias, com início do tratamento 7 dias após a cirurgia.	63
Figura 19. Efeito do tratamento por 8 dias com CDPPB no déficit de memória induzido pela A β na TRO. Tratamento iniciado no mesmo dia da cirurgia.	64
Figura 20. Efeito do tratamento por 8 dias com CDPPB no déficit de memória induzido pela A β na TRO. Tratamento iniciado 7 dias após a cirurgia.	65
Figura 21. Efeito do tratamento com CDPPB no déficit de memória induzido por A β no medo condicionado ao contexto.	65
Figura 22. Performance dos animais no labirinto em Y.	66
Figura 23. Efeito do CDPPB sobre a viabilidade neuronal após injeção de A β 1-42.	67
Figura 24. Efeito do CDPPB sobre a neurodegeneração após injeção de A β 1-42.	68
Figura 25. Efeito do CDPPB na expressão de BDNF após a injeção de A β	69
Figura 26. Efeito do CDPPB sobre a expressão de Iba-1 e GFAP no hipocampo ipsilateral em animais submetidos à cirurgia para injeção de A β tratados ou não com CDPPB.	70
Figura 27. Imagem representativa de gel de agarose com bandas positivas para o transgene APP.	73
Figura 28. Massa corporal dos animais T41 de 14 meses de idade e seus controles, submetidos ao tratamento com CDPPB 5 mg/Kg ou seu veículo por 28 dias.	74
Figura 29. Índice de reconhecimento de objetos dos animais T41 e controles com 14 meses de idade tratados com CDPPB ou seu veículo.	75
Figura 30. Medo condicionado ao contexto de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade tratados com CDPPB ou seu veículo.	75
Figura 31. Índice de alternância no labirinto em Y de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade tratados com CDPPB ou seu veículo.	76
Figura 32. Interação social de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade.	77

<i>Figura 33. Memória social de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 34. Número de bolinhas enterradas pelos animais transgênicos T41 com 14 meses de idade.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 35. Labirinto em cruz elevado de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 36. Efeito do CDPPB sobre a viabilidade neuronal em animais T41 tratados ou não com CDPPB.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 37. Efeito do CDPPB na expressão de Aβ 1-40 em animais T41.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 38. Efeito do CDPPB sobre a expressão de Iba-1, CD68 e GFAP em animais T41 tratados ou não com CDPPB.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 39. Dosagem de colesterol total (A) e triglicérides (B) de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade.</i>	<i>85</i>
<i>Figura 40. Dosagem de FA (A) e ALT (B) de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade.</i>	<i>86</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo de experimentos realizados com cada grupo de animais experimentais.	47
Tabela 2. Análise estatística da concentração de citocinas nos hipocampos ipsi e contralateral dos animais submetidos ao protocolo 1 de tratamento.	71
Tabela 3. Análise estatística da concentração de citocinas no córtex pré-frontal ipsi e contralateral dos animais submetidos ao protocolo 1 de tratamento.	72
Tabela 4. Análise estatística da concentração de citocinas nos hipocampos ipsi e contralateral dos animais submetidos ao protocolo 2 de tratamento.	72
Tabela 5. Análise estatística da concentração de citocinas no córtex pré-frontal ipsi e contralateral dos animais submetidos ao protocolo 2 de tratamento.	73
Tabela 6. Análise estatística da concentração de citocinas no hipocampo dos animais transgênicos tratados com CDPPB e seus controles.	84
Tabela 7. Análise estatística da concentração de citocinas no córtex pré-frontal dos animais transgênicos tratados com CDPPB e seus controles.	84

LISTA DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1. Protocolo 1 de cirurgia estereotáxica e tratamento com CDPPB em animais C57Bl/6, com experimentos comportamentais realizados.....</i>	<i>44</i>
<i>Esquema 2. Protocolo 2 de cirurgia estereotáxica e tratamento com CDPPB em animais C57Bl/6, com experimentos comportamentais realizados.....</i>	<i>45</i>
<i>Esquema 3. Protocolo de tratamento com CDPPB em animais T41 e experimentos comportamentais realizados.....</i>	<i>46</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-araçdonoilglicerol

α 7-nAChR: receptor α 7-nicotínico de acetilcolina

A β : amiloide- β

ACh: Acetilcolina

AChR: receptor de acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

ADRDA: *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*

AKT: *protein kinase B*, (proteína quinase B)

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ANOVA: Análise de variância

APH-1: *anterior pharynx-defective 1*

APOE: apolipoproteína E

APP: *amyloid precursor protein* (proteína precursora de amiloide)

BDNF: Fator neurotrófico derivado do encéfalo

BSA: *bovine serum albumin* (soroalbumina bovina)

BuChE: Butirilcolinesterase

CA1 e CA3: Corno de Ammon - regiões 1 e 3

CBA: *cytometric bead array*

CDK5: *cyclin-dependent kinase* (quinase dependente de ciclina)

CE: córtex entorrinal

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CDPPB: 3-Ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il)benzamida

DA: Doença de Alzheimer

DAG: diacilglicerol

DSM-IV: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV* (Manual Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais IV)

EDTA: Ácido etil-diamino-tetra-acético

EPM: Erro Padrão da Média

ERK: *extracellular signal-regulated kinase* (quinase regulada por sinal extracelular)

ERO: espécie reativa do oxigênio

FJC: Fluoro-Jade® C

GD: giro denteado

GirK: canal de potássio acoplado a proteína G ativado interiormente

GPCR: *G protein coupled receptors* (receptores acoplados à proteína G)

GSK3-β: *glycogen synthase kinase 3-β* (quinase de glicogênio-sintase 3-β)

IFN-γ: interferon gamma

ICE: *IL-1 converting enzyme* (enzima conversora de IL-1)

IL: interleucina

IL-1Ra: *IL-1 receptor antagonist* (antagonista de receptor IL-1)

i.p.: intraperitoneal

IP3: inositol 1,4,5-trifosfato

JNK: *C-Jun-N-terminal kinase* (quinase C-Jun-N-terminal)

KCNQ: família Kv7 de canais de potássio dependentes de voltagem

LC: *locus coeruleus*

LCE: labirinto em cruz elevado

LPS: lipopolissacarídeo

LTD: *long-term depression* (depressão de longa duração)

LTP: *long-term potentiation* (potenciação de longa duração)

MAN: modulador alostérico negativo

MAP: modulador alostérico positivo

MAS: modulador alostérico silencioso

MEK: proteína quinase ativada por mitógeno

M-CSF: *macrophage-colony stimulating factor* (fator estimulante de colônia de macrófagos)

mGluR: *metabotropic glutamate receptor* (receptor metabotrópico de glutamato)

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

NFκB: *nuclear factor κB* (fator nuclear κB)

NGF: *nerve growth factor* (fator de crescimento do nervo)

NINCDS: *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Strokes*

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)

ns: não significativo

OA: Objeto antigo

ON: Objeto novo

PBS: *phosphate buffered saline* (tampão fosfato em salina)

PEN-2: *presinilin enhancer 2* (potenciador da PSEN)

PET: *positron emission tomography* (tomografia de emissão de pósitrons)

PFA: Paraformaldeído

PIP2: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PLC: fosfolipase C

PKC: *protein kinase C* (proteína quinase C)

PMSF: Fenilmetilsulfonila

PRP^c: proteína priônica celular

PRR: *pattern recognition receptor* (receptor de reconhecimento de padrão)

PSEN: presenilina

RD: rafe dorsal

RM: ressonância magnética

RMN: ressonância magnética nuclear

SAMP: *Senescence-accelerated mouse prone* (modelo animal com predisposição a senescência acelerada)

SN: substância negra

SNC: sistema nervoso central

TGF- β 1: *transforming growth factor β 1* (fator de transformação do crescimento β 1)

TLR: *toll-like receptors* (receptores tipo toll)

TNF- α : *tumor necrose factor α* (fator de necrose tumoral α)

TRO: tarefa de reconhecimento de objetos

WT: *wild type* (selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Doença de Alzheimer	19
1.2 Terapia farmacológica da DA	28
1.3 Modelos experimentais para estudo de DA	30
1.4 Envolvimento do sistema glutamatérgico na DA	31
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Animais	40
3.2 Drogas	40
3.2.1 Síntese do CDPPB	40
3.3 Cultura primária de neurônios hipocampais	41
3.4 Ensaio de morte celular	41
3.5 Avaliação da ativação de vias de sinalização intracelulares	42
3.6 Cirurgia estereotáxica e microinjeção intrahipocampal de A β 1-42 em C57Bl/6	43
3.7 Modelos animais	44
3.7.1 Animais submetidos à cirurgia	44
3.7.2 Animais T41	45
3.8 Tarefa de Reconhecimento de Objetos	47
3.9 Medo condicionado ao contexto	48
3.10 Labirinto em Y	48
3.11 Interação e memória social	49
3.12 Marble burying	50
3.13 Labirinto em cruz elevado (LCE)	50
3.14 Coleta de sangue, perfusão intracardíaca e preparo dos cérebros para técnicas histológicas	50
3.15 Retirada de tecidos para análises bioquímicas	51
3.16 Estereologia para marcação de NeuN	51
3.17 Marcação com Fluoro-Jade C [®] para avaliação de morte neuronal	53
3.18 Avaliação da expressão de BDNF e de de A β por <i>western blotting</i>	53
3.19 Microscopia confocal para marcação de células Iba-1 ⁺ , CD68 ⁺ e de células GFAP ⁺	54
3.20 Medidas dos níveis de citocinas no hipocampo	55
3.21 Dosagens sanguíneas de colesterol, triglicérides e enzimas hepáticas	55
3.22 Análise estatística	56

4 RESULTADOS.....	57
4.1 Síntese do CDPPB.....	57
4.2 Efeitos de CDPPB frente ao estímulo com A β	58
4.2.1 CDPPB previne a morte neuronal induzida por A β 1-42 em culturas de neurônios hipocampais	58
4.2.2 Efeito de CDPPB sobre a ativação de vias intracelulares em culturas de neurônios hipocampais	60
4.2.3 CDPPB não altera a massa corporal dos animais ao longo dos dias de tratamento	63
4.2.4 CDPPB previne o déficit de memória induzido por A β 1-42 na TRO	64
4.2.5 CDPPB previne a diminuição do condicionamento ao medo induzido pela A β	65
4.2.6 A β não induz déficit cognitivo no labirinto em Y	66
4.2.7 CDPPB reverte parcialmente a diminuição de células NeuN ⁺ induzida por A β no GD.....	67
4.2.8 CDPPB previne a neurodegeneração induzida por A β no GD do hipocampo	67
4.2.9 CDPPB aumenta os níveis de BDNF nos hipocampus ipsi- e contralateral.....	68
4.2.10 Efeito do CDPPB sobre a ativação micróglia e astrocitária	69
4.2.11 Efeito do CDPPB sobre citocinas anti e pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal de animais que foram injetados com A β	71
4.3 Avaliação de animais transgênicos T41 e dos efeitos de CDPPB	73
4.3.1 Genotipagem dos animais T41 e seus controles.....	73
4.3.2 CDPPB não altera a massa corporal dos animais ao longo dos dias de tratamento	74
4.3.3 CDPPB não previne o déficit de memória em modelo transgênico de DA.....	74
4.3.4 Não há condicionamento ao medo em animais T41 com 14 meses de idade e esse comportamento não é alterado por CDPPB.....	75
4.3.5 Não há alteração das alternâncias no labirinto em Y em animais T41 com 14 meses de idade e esse comportamento não é alterado por CDPPB.....	76
4.3.6 Não há alteração da interação e da memória social em animais T41 com 14 meses de idade, mas o CDPPB aumenta a interação social em camundongos T41	77
4.3.7 Há redução no comportamento de enterrar em animais T41, mas o CDPPB não exerce nenhuma alteração sobre o mesmo	78
4.3.8 Não há alteração do comportamento tipo ansioso no LCE em animais T41 e nenhum efeito do CDPPB é observado	79
4.3.9 CDPPB aumenta a viabilidade neuronal em animais T41 com 14 meses de idade.....	80
4.3.10 CDPPB não diminui a quantidade de A β 1-40 no hipocampo e no córtex pré-frontal animais T41 com 14 meses de idade.....	81
4.3.11 CDPPB reduz parcialmente a marcação de CD68 em CA1, mas não altera a expressão de Iba-1 e GFAP hipocampais nos animais T41 com 14 meses de idade ...	82

4.3.12 Não há alteração de citocinas anti e pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal de animais T41 com 14 meses de idade	84
4.3.15 Efeito do CDPPB sobre lipídeos séricos e função hepática	85
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez, em 1906, pelo médico alemão Dr. Alois Alzheimer, ao relatar o caso de uma paciente com profunda perda de memória e alterações psicológicas. Na autópsia dessa paciente foi também possível identificar uma redução do volume cerebral e depósitos anormais no entorno e no interior de células nervosas, mais tarde identificados como agregados do peptídeo amiloide- β ($A\beta$) e da proteína tau, respectivamente (SHAMPO; KYLE; STEENSMA, 2013).

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, cujos principais sinais são falhas de memória que se agravam com declínio cognitivo e funcional progressivos, culminando em demência (KUMAR; DHULL; MISHRA, 2015; MOODLEY; CHAN, 2014). É também a forma mais prevalente de demência, sendo responsável por 60 a 80% dos casos dessa condição e afetando principalmente pessoas com 65 anos ou mais (COLOVIC et al., 2013; KNOWLES et al., 2013; PREDIGER et al., 2007). Demência é caracterizada por declínio cognitivo, funcional e comportamental progressivos, que impactam na independência e no convívio social (MOHAMMAD et al., 2017; REEVE et al., 2017). Dentre os sintomas de demência estão perda de memória, prejuízo de raciocínio e julgamento, e dificuldade de comunicação (REEVE et al., 2017). No ano de 2015, cerca de 46,8 milhões de pessoas apresentavam demência, e estima-se que este número aumentará para 74,7 e 131,5 milhões em 2030 e 2050, respectivamente (PRINCE, 2016; SUBRAMANIAM et al., 2015).

Com o passar dos anos, o aumento da incidência da DA tem sido relacionado com o aumento da expectativa de vida e com a mudança de hábitos da população mundial. Esses dados indicam a doença como um problema de saúde pública (PRINCE, 2016; SUBRAMANIAM et al., 2015). No Brasil, a mortalidade anual devido à DA aumentou 8,4% em mulheres e 7,7% em homens com idades entre 60 e 79 anos; e 15,5% em mulheres e 14% em homens com idade superior a 80 anos, entre os anos de 2000 e 2009 (TEIXEIRA, J. B. et al., 2015).

Os fatores de risco da DA se dividem entre ambientais e genéticos, levando ao aparecimento da DA esporádica ou familiar, respectivamente. Dentre os fatores de risco esporádicos estão baixa escolaridade, doenças cardiovasculares, diabetes,

obesidade, tabagismo e sedentarismo, sendo o principal fator de risco o envelhecimento. A incidência da doença aumenta a partir da idade de 65 anos, caracterizando a DA de início tardio (DE BRUIJN; IKRAM, 2014; IMTIAZ et al., 2014; POVOVA et al., 2012). Além disso, estima-se que a prevalência seja maior em mulheres do que homens em diversos estudos (FIEST et al., 2016). As possíveis causas tem sido associadas a fatores como diferenças na reserva cognitiva, resiliência, genética e alterações cerebrais funcionais e estruturais (LAWS; IRVINE; GALE, 2018). Além disso, a redução de hormônios esteroides associada ao envelhecimento pode aumentar a predisposição à DA, o que no caso de mulheres está relacionada a uma diminuição rápida de estradiol e progesterona com a menopausa (BARRON; PIKE, 2012; LI, R.; SINGH, 2014; VEST; PIKE, 2013).

Apesar da maioria dos casos tardios de DA ser esporádica, mutações genéticas estão associadas com uma parte dos casos dessa forma da doença. A maior parte das mutações envolvidas no aparecimento do Alzheimer nessa fase da vida ocorre em genes implicados no metabolismo de colesterol, em resposta imune, em endocitose e em transporte mediado por vesículas. Dentre eles, as mutações no gene que codifica a apolipoproteína E (APOE) são o fator de risco genético mais prevalente para incidência tardia da DA (CARMONA; HARDY; GUERREIRO, 2018).

O diagnóstico anterior a 65 anos de idade caracteriza a DA de início precoce. Apesar de ocorrerem casos esporádicos antecedendo essa idade, a maioria dos casos de DA de início precoce está associado com mutações genéticas (MENDEZ, 2017). A maior parte das mutações associadas com essa forma da doença ocorre nos genes que codificam a proteína precursora de amiloide (APP, *amyloid precursor protein*), a presenilina (PSEN) -1 ou a PSEN-2 (KUNKLE et al., 2017; LANOISELEE et al., 2017).

As alterações fisiopatológicas da DA se iniciam anos antes do aparecimento dos sinais. Já foi demonstrado que uma das principais causas da doença é o aumento da produção do peptídeo A β , formado a partir da APP (Figura 1) (GRIMM et al., 2013; HAMILTON et al., 2014; JIANG et al., 2014; KUMAR et al., 2015; LAZZARI et al., 2015; ROBINSON et al., 2014). A APP é uma proteína transmembrana que possui função na transdução de sinais, alongamento axonal, adesão e migração celular, transporte de proteínas e sinaptogênese (JIANG et al., 2014), além da função de seu domínio C-terminal na regulação de expressão gênica e sobrevivência neuronal (MOKHTAR et al., 2013). Ela sofre clivagem proteolítica sequencial pelas enzimas β -

e γ -secretase. Sua clivagem amiloidogênica é iniciada pela β -secretase, o que gera um fragmento ligado à membrana que contém 99 resíduos do fragmento C-terminal da APP. Este fragmento passa por clivagem adicional pela γ -secretase, uma protease composta por PSEN-1, PSEN-2, nicastrina, APH-1 (do inglês *anterior pharynx-defective 1*) e PEN-2 (do inglês *presenilin enhancer 2*), gerando resíduos de A β . O local de clivagem pela γ -secretase é impreciso (CARMONA et al., 2018; MURPHY; LEVINE, 2010), gerando resíduos contendo entre 37 e 42 aminoácidos (Figura 1) (XU et al., 2016). Os resíduos mais frequentes são de A β 1-40 (80-90%), seguidos por de A β 1-42 (5-10%), sendo este último mais hidrofóbico, fibrinogênico e neurotóxico (LAZZARI et al., 2015; MURPHY; LEVINE, 2010). Acredita-se que a clivagem pela β -secretase é a etapa limitante da via amiloidogênica, processando aproximadamente 10% da APP celular (MURPHY; LEVINE, 2010). A APP pode também sofrer clivagem não-amiloidogênica, que é realizada pela enzima α -secretase, que gera a proteína sAPP α , a qual possui papel protetor por promover a clivagem proteolítica da sequência peptídica da A β na APP, inibindo a produção do peptídeo (WANG, Y. Q.; QU; WANG, 2016).

A DA também é caracterizada pela formação de emaranhados neurofibrilares (Figura 1), compostos pela proteína tau hiperfosforilada. A tau se encontra naturalmente associada aos microtúbulos, estando envolvida na estabilização desta organela (SPILLANTINI; GOEDERT, 2013). Essa proteína também possui importância em processos de aprendizagem e formação memória de curta duração, sendo que sua ausência pode causar déficits cognitivos (BIUNDO et al., 2018). Na DA e em outras condições patológicas, ocorre a hiperfosforilação da tau, o que a torna incapaz de interagir com os microtúbulos (SPILLANTINI; GOEDERT, 2013). Em decorrência disso, ocorre sua agregação e acúmulo em conjunto com filamentos helicoidais pareados, formando os emaranhados neurofibrilares (MOKHTAR et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que a A β solúvel pode induzir a hiperfosforilação de tau por ação de diferentes quinases (CORTES et al., 2018; LLORET et al., 2015), e que as alterações iniciais presentes na doença possivelmente são decorrentes das interações entre a proteína tau e o peptídeo A β (MOKHTAR et al., 2013). Evidências indicam que, apesar da toxicidade induzida por A β ter início anterior aos danos causados pela tau, o peptídeo A β acarreta a disfunção sináptica dependente da proteína tau (BLOOM, 2014).

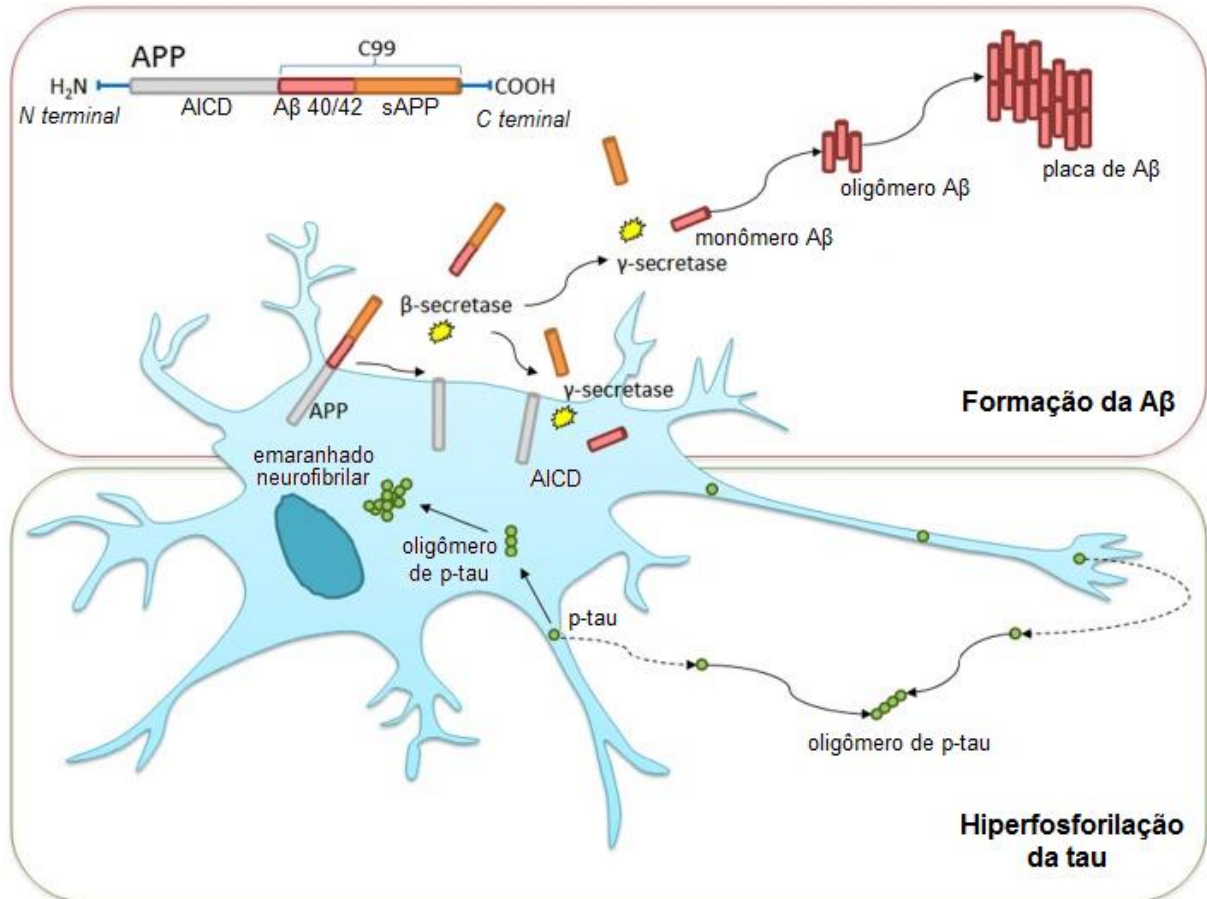


Figura 1. Formação de A β e tau. A APP é clivada pelas enzimas β e γ secretase para formar peptídeos em sua maioria contendo entre 40 e 42 resíduos de aminoácidos. A proteína tau é hiperfosforilada, se acumulando e formando os emaranhados neurofibrilares (LIM et al., 2016).

A neurotoxicidade da A β na DA pode ser causada tanto pelo acúmulo de formas solúveis quanto de formas insolúveis, causando eventos citotóxicos, desencadeando morte celular, comprometendo a integridade das células por interação direta com a membrana celular (OW; DUNSTAN, 2014), e interrompendo a transmissão sináptica devido à ligação a sítios na membrana de neurônios em certas sinapses (RENNER et al., 2010). Além disso, a interação de A β com receptores microgliais pode causar neuroinflamação, bem como acredita-se que o peptídeo causa peroxidação lipídica e a produção de várias espécies reativas de oxigênio (EROs) (OW; DUNSTAN, 2014). Ainda, já foi demonstrado que, em sua forma patológica, a tau prejudica a transmissão sináptica através da interação de seu domínio N-terminal com vesículas sinápticas, impedindo a liberação normal de neurotransmissores (ZHOU et al., 2017).

A toxicidade neuronal que ocorre como consequência do acúmulo de A β e da hiperfosforilação de tau acarreta perda sináptica, morte neuronal e atrofia cerebral (KOCAHAN; DOGAN, 2017; LAZZARI et al., 2015), principalmente no córtex

entorrinal e nos hipocampos (HAMPEL et al., 2002; HOLTZMAN; MORRIS; GOATE, 2011). A diminuição da densidade sináptica observada nas regiões mesotemporais ainda em estágios iniciais da DA se correlaciona com o aparecimento dos déficits cognitivos, (BROUILLETTE, 2014), bem como o grau de declínio cognitivo se correlaciona com a extensão da perda sináptica (SELKOE, 2002), especialmente nas regiões que são responsáveis pela formação e armazenamento de novas informações. O circuito mais vulnerável é a via perforante medial, que se origina na camada II do córtex entorrinal e termina na camada molecular externa do giro denteado (GD) do hipocampo, e que possui como principal neurotransmissor excitatório o glutamato (KOCAHAN; DOGAN, 2017). Os mecanismos envolvidos nas perdas sináptica e neuronal induzidas por A β podem envolver a desregulação de receptores glutamatérgicos e proteínas *scaffold* que resultam em alterações mitocondriais e no transporte axonal de vesículas sinápticas, que, por sua vez, levam a alterações dendríticas e espinhais, distrofia axonal e perda neuronal (OVERK; MASLIAH, 2014). Ocorre perda neuronal e atrofia da camada II do CE, bem como perda sináptica no GD e neurodegeneração e atrofia do corno de Ammon (CA) 1 no hipocampo (BROUILLETTE, 2014), comprometendo o processo de codificação da memória espacial, que está associado com as regiões CA1, CA3 e GD (MOORTHI et al., 2015). A degeneração da via perforante medial se correlaciona com a atrofia do complexo subicular, já que é por onde as projeções da via penetram no hipocampo (CARLESIMO et al., 2015).

Evidências sugerem que as memórias são mantidas temporariamente na região do hipocampo, possivelmente através de vias originadas da amígdala para outras regiões do cérebro, através da potenciação de longa duração (LTP, *long-term potentiation*), o que permite o armazenamento de memória de curta duração através de um circuito neuronal. O hipocampo, suas regiões associadas que projetam para o neocórtex e a amígdala atuam em conjunto para consolidar as informações da memória de curta duração à memória de longa duração (MOORTHI et al., 2015).

A plasticidade sináptica, bem como a formação e a consolidação de memória são dependentes de LTP e de depressão de longa duração (LTD, *long-term depression*). A LTP aumenta a eficácia da transmissão sináptica, chamada força sináptica, e está presente nas sinapses hipocampais da via perforante, no CA1 e GD, possuindo uma fase curta e outra longa, e sendo dependente de receptores glutamatérgicos. Já a LTD diminui a força sináptica, mesmo em sinapses

potencializadas. Sendo assim, as medidas de LTP e LTD são importantes marcadores da integridade e performance das sinapses (MA, T.; KLANN, 2012; PEINEAU et al., 2018). Dependendo do padrão de ativação sináptica e do nível geral de excitação da rede neural, a força sináptica é alterada dinamicamente, levando à formação de circuitos neurais (VITUREIRA; GODA, 2013). Vários estudos já demonstraram que altas concentrações do peptídeo A β , ao comprometerem a função sináptica, prejudicam esses processos importantes para a formação de memória, levando a uma perda de LTP e aumento de LTD (MA, T.; KLANN, 2012; PEINEAU et al., 2018).

Com a progressão da doença, há aumento da neurodegeneração hipocampal e cortical, além de acometimento de outras áreas cerebrais, resultando no aparecimento de outros sintomas, como dificuldade de planejamento, de julgamento e de realização das tarefas cotidianas, confusão espacial, problemas de linguagem, isolamento social e alterações de humor e personalidade (ALZHEIMER'S, 2011; BROUILLETTE, 2014). Além disso, o hipocampo é uma das poucas regiões cerebrais capazes de produzir novos neurônios na vida adulta. Dessa maneira, há prejuízo também da neurogênese hipocampal na DA (TEIXEIRA, C. M. et al., 2018).

A perda de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal é outra anormalidade da DA, e também se correlaciona com o déficit cognitivo (BROUILLETTE, 2014). O envolvimento do sistema colinérgico é reforçado por estudos que demonstram antagonistas colinérgicos prejudicando a memória de animais, bem como por déficits de memória acarretados por lesões que comprometem a integridade das projeções colinérgicas para o hipocampo e neocórtex. Além da degeneração dos neurônios colinérgicos, a captação de colina, a atividade da colina acetiltransferase e a síntese de acetilcolina (ACh) também estão reduzidas na DA, contribuindo para a redução da neurotransmissão colinérgica (Figura 2) (PARSONS et al., 2013).

O hipocampo recebe não apenas aferentes glutamatérgicos e colinérgicos, mas também dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos (JEON et al., 2018). A degeneração de neurônios dopaminérgicos provenientes da substância negra (SN) está associada ao déficit cognitivo e disfunção da neurogênese na DA. A diminuição da noradrenalina proveniente do *locus coeruleus* (LC) também compromete a cognição. Já o comprometimento das sinapses serotoninérgicas, originadas na rafe dorsal, está associado com os sintomas neuropsiquiátricos da DA, como agitação, depressão e ansiedade (JEON et al., 2018).

Outro fator que contribui para a excitotoxicidade é a desregulação da sinalização do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), uma neurotrofina amplamente expressa no sistema nervoso central (SNC) que, através da ativação de seu receptor de tirosina-quinase B (TrkB), desempenha um papel crucial na sobrevivência e diferenciação celular, alongamento axonal, crescimento dendrítico e plasticidade sináptica, necessários para aquisição e consolidação da memória. Na DA há alterações nos níveis e na expressão de BDNF por ação da A β (SONG; YU; TAN, 2015; TANQUEIRO et al., 2018).

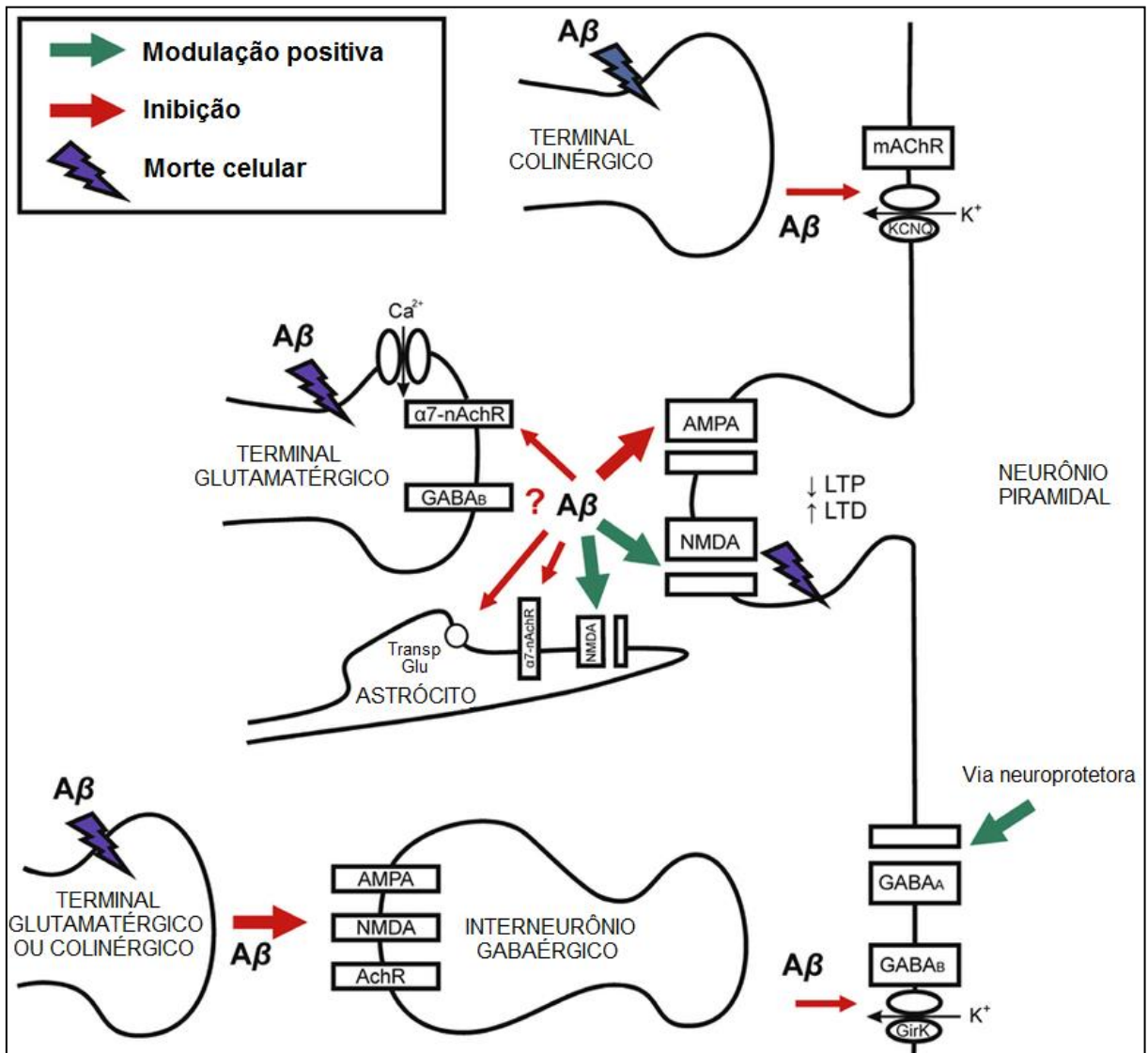


Figura 2. Mecanismos de disfunção sináptica na DA. Desenho esquemático mostrando o papel do A β na neurotransmissão na DA. A A β induz neurodegeneração, com diminuição dos terminais sinápticos (esquerda) nas células principais e nos interneurônios inibitórios. O declínio inicial da memória está correlacionado com a disfunção sináptica induzida por A β nos receptores excitatórios e inibitórios e na neurotransmissão (NAVA-MESA et al., 2014).

Acredita-se que a presença do peptídeo A β induza a ativação microglial, iniciando o processo neuroinflamatório presente na DA (CORTES et al., 2018). No SNC, a micróglia é considerada o componente mais importante da resposta imune inata (HENEKA, 2014), e sua presença no entorno das placas amiloides é reportado tanto em humanos quanto em modelos transgênicos da DA (RAJENDRAN; PAOLICELLI, 2018). O peptídeo A β pode interagir com diferentes receptores microgliais, induzindo essas células a um estado inflamatório e promovendo a fagocitose do peptídeo (BAMBERGER et al., 2003; EL KHOURY et al., 1996; STEWART et al., 2010). Isso indica um papel protetor em estágios iniciais da doença (HICKMAN; ALLISON; EL KHOURY, 2008; KRABBE et al., 2013). Contudo, o acúmulo excessivo no entorno das placa amiloides (CRAS et al., 1990), que ocorre com a progressão da DA, sugere que a micróglia perca a capacidade de processar o excesso do peptídeo A β (DE CALIGNON et al., 2012). Em um estado hiperativado, a micróglia associada a placas de A β apresenta expressão aumentada de vários genes associados com processo inflamatório (YIN et al., 2017). Além disso, a proteína tau também pode ativar a micróglia (DE CALIGNON et al., 2012).

A micróglia ativada pode produzir e secretar diversos mediadores inflamatórios, como fator nuclear κ B (NF κ B, *nuclear factor κ B*), citocinas, quimiocinas e EROs, levando à ativação de receptores neuronais. Como consequência, pode ocorrer aumento de expressão do complexo CDK5/p35, GSK3- β , hiperfosforilação e agregação de tau e consequente neurodegeneração, que pode promover a reativação de células microgliais, formando uma cascata de ativação contínua (CORTES et al., 2018). Essas substâncias ainda inibem a expressão de receptores de ligação da A β e a atividade de enzimas que processam esse peptídeo (GIOVANNINI et al., 2002; HICKMAN et al., 2008; KRABBE et al., 2013). Ademais, estudos recentes sugerem que a remoção de sinapses mediada por micróglia, geralmente presente na fase de desenvolvimento cerebral, pode ser reativada durante o envelhecimento e a DA, sendo dependente dos mediadores do complemento C1q e C3 (RAJENDRAN; PAOLICELLI, 2018).

Os astrócitos também possuem papel importante na degradação de A β (WYSS-CORAY et al., 2003). Fatores inflamatórios podem regular receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, *pattern recognition receptors*) em astrócitos, como os receptores tipo toll (TLR, *toll-like receptors*) 2, 3 e 4 (HAMBY et al., 2012; HOLM; DRAEBY; OWENS, 2012; ZAMANIAN et al., 2012). Entretanto, a astrogliose se inicia

em estágios iniciais da DA, acompanhando a progressão da doença (RODRIGUEZ-VIEITEZ et al., 2016). A própria microglia ativada pode induzir a ativação de astrócitos, que podem, por sua vez, secretar neurotoxinas ou liberar componentes do complemento que contribuem para a perda sináptica (LIDDELOW et al., 2017).

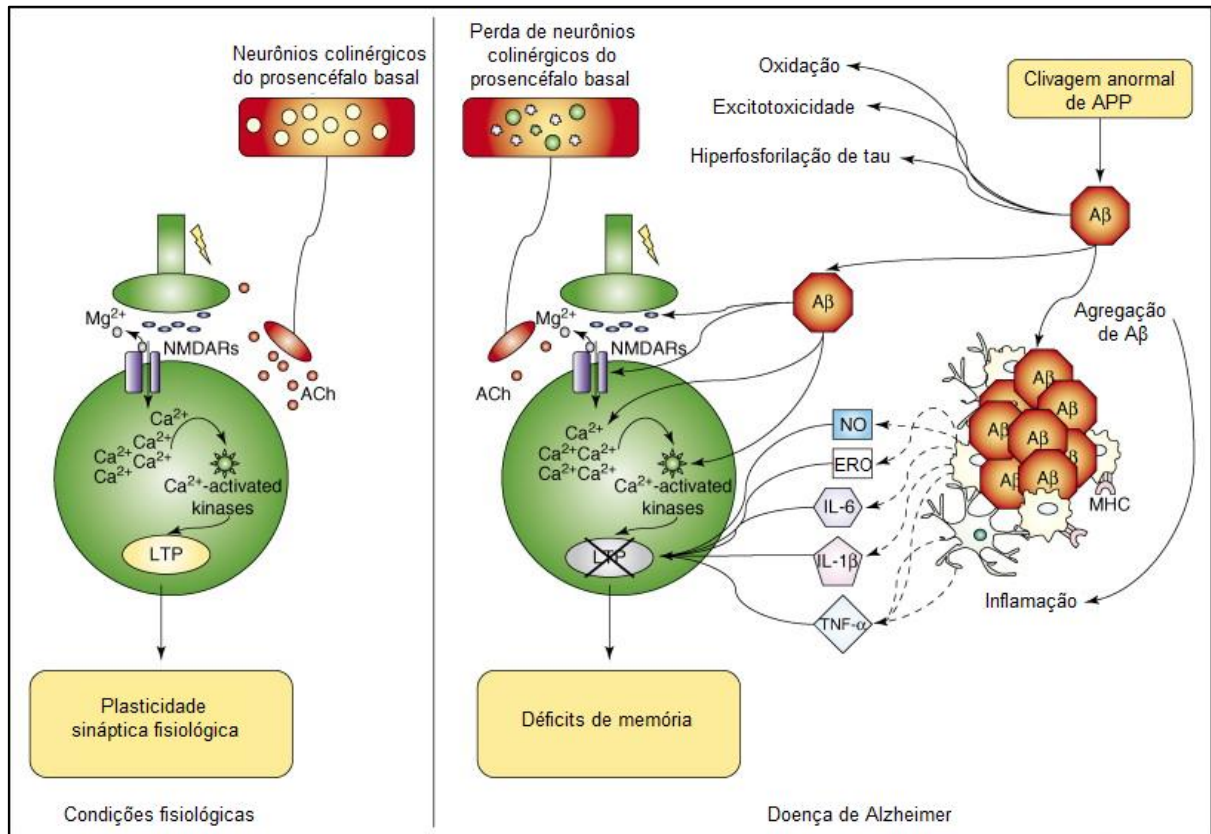


Figura 3. O círculo vicioso que leva à neuroinflamação, perda de LTP e degeneração neuronal durante a DA. Em condições fisiológicas (esquerda), a ativação sináptica de receptores pós-sinápticos de NMDA leva à entrada de Ca^{2+} e à ativação de vários sistemas de transdução de sinal, resultando em potenciação duradoura da força sináptica. A produção e acúmulo de A β (direita) induz danos neuronais através de múltiplos mecanismos, incluindo processos oxidativos e excitotóxicos, ativação de micrógliia e astrócitos, com subsequente liberação de mediadores inflamatórios. Esses mediadores, por sua vez, promovem o acúmulo de A β , desencadeando um círculo vicioso. A β prejudica LTP através de efeito direto na sinalização do glutamato e das proteínas quinases, ou indireto, através da ação de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, ROS ou NO). O círculo vicioso desencadeado acaba por resultar na disfunção sináptica e comprometimento de LTP, resultando, portanto, no aparecimento dos sintomas cognitivos presentes na doença (DI FILIPPO et al., 2008).

Os mediadores inflamatórios secretados por células ativadas na DA contribuem para a progressão da doença (Figura 3). Tanto as citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)- 1 β , IL-18, e IL-33, quanto as anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-13, possuem expressão aumentada no cérebro de pacientes com DA (MORIMOTO et al., 2011). Além disso, algumas citocinas e moléculas relacionadas a elas, como o antagonista de receptor IL-1 (IL-1Ra, *IL-1 receptor antagonist*), a enzima conversora

de IL-1 (ICE, *IL-1 converting enzyme*), IL-2, IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral α (TNF- α , *tumor necrose factor α*), o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF, *macrophage-colony stimulating factor*) e o fator de transformação do crescimento β 1 (TGF- β 1, *transforming growth factor β 1*), estão aumentadas em estágios que precedem os primeiros sintomas da doença (WILBERDING et al., 2008).

Muitos foram os avanços nos últimos anos acerca do conhecimento da fisiopatologia da DA, no entanto, ainda não existem biomarcadores de fácil detecção em exames de rotina laboratorial. O diagnóstico de DA no Brasil segue critérios clínicos padronizados como os do *Diagnostic and Statistic Manual (DSM) III-R*, *DSM IV* e *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)* (ALBERT et al., 2011; JACK et al., 2011).

A primeira parte da investigação consiste em achados clínicos e testes neurológicos, porém a sua confirmação definitiva só é feita por exame histopatológico. O diagnóstico de provável ou possível Alzheimer é feito com base em exames cognitivos associados com exames de imagem, como ressonância magnética (RM) e tomografia de emissão de pósitrons (PET, *positron emission tomography*), para detecção de atrofia hipocampal e hipometabolismo cortical, respectivamente (ABBASI, 2018; KHOURY et al., 2017; MCKHANN et al., 2011; MURPHY; LEVINE, 2010).

Além disso, tem sido demonstrada a importância de biomarcadores no líquido cérebro-espinhal para confirmação do diagnóstico da DA. A presença do peptídeo A β 1-42 e da tau nas formas total e fosforilada são capazes de aumentar a precisão diagnóstica da DA. A utilização de biomarcadores de imagem em exames de PET para detecção de A β e tau também tem sido estudada para inclusão nos critérios de diagnóstico (KHOURY et al., 2017), e biomarcadores genéticos já são pesquisados em casos de presença de DA na família (KHOURY et al., 2017).

1.2 Terapia farmacológica da DA

Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia da doença e dos esforços para elucidar potenciais alvos terapêuticos, as terapias disponíveis atualmente para o tratamento da DA são limitadas a duas classes de fármacos (KUMAR et al., 2015). A primeira delas é a de inibidores da colinesterase, que engloba

3 medicamentos aprovados para uso: donepezila, rivastigmina e galantamina. A outra classe é de antagonistas do receptor de NMDA, que possui apenas a memantina aprovada para tratamento da DA (KHOURY; RAJAMANICKAM; GROSSBERG, 2018; PATEL; GROSSBERG, 2011; WINSLOW et al., 2011).

Em virtude de uma das primeiras alterações cerebrais na DA envolver o comprometimento da neurotransmissão colinérgica, os inibidores da colinesterase, ao inibirem as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), reduzem a degradação da ACh, permitindo uma maior disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica e melhorando sintomas relacionados à memória e cognição (COLOVIC et al., 2013; GEERTS; GROSSBERG, 2006).

Por outro lado, a memantina é um antagonista não competitivo dependente de voltagem do receptor de NMDA, sendo utilizada como tratamento coadjuvante ou alternativo aos inibidores das colinesterases na DA moderada e grave (ARIF et al., 2009; ROBERSON; MUCKE, 2006). Ela reduz a sinalização patológica disfuncional do glutamato, permitindo melhor percepção dos sinais fisiológicos e podendo prevenir a excitabilidade glutamatérgica excessiva (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017; GEERTS; GROSSBERG, 2006; PARSONS et al., 2013).

Apesar desses medicamentos proporcionarem uma melhoria sintomática, não existem evidências de que esses apresentem propriedades de modificar o curso da doença (ELETI, 2016). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de terapias eficazes e seguras com o objetivo de alterar a progressão da patologia (RUTHIRAKUHAN et al., 2016).

A busca por novas terapias para a DA (Figura 4) tem se concentrado principalmente nos sistemas neurotransmissores e nas duas principais características fisiopatológicas da doença, o acúmulo de $A\beta$ e de tau. As principais terapias em desenvolvimento até o momento são imunoterapias anti-amiloide, inibidores de β e γ -secretase, e terapias que possuem como alvo a tau. Apesar do grande número de terapias promissoras que tem sido desenvolvida, nenhuma teve eficácia comprovada em estudos clínicos, sendo que muitos estudos falharam por problemas de eficácia, tolerância e toxicidade (KHOURY et al., 2017).

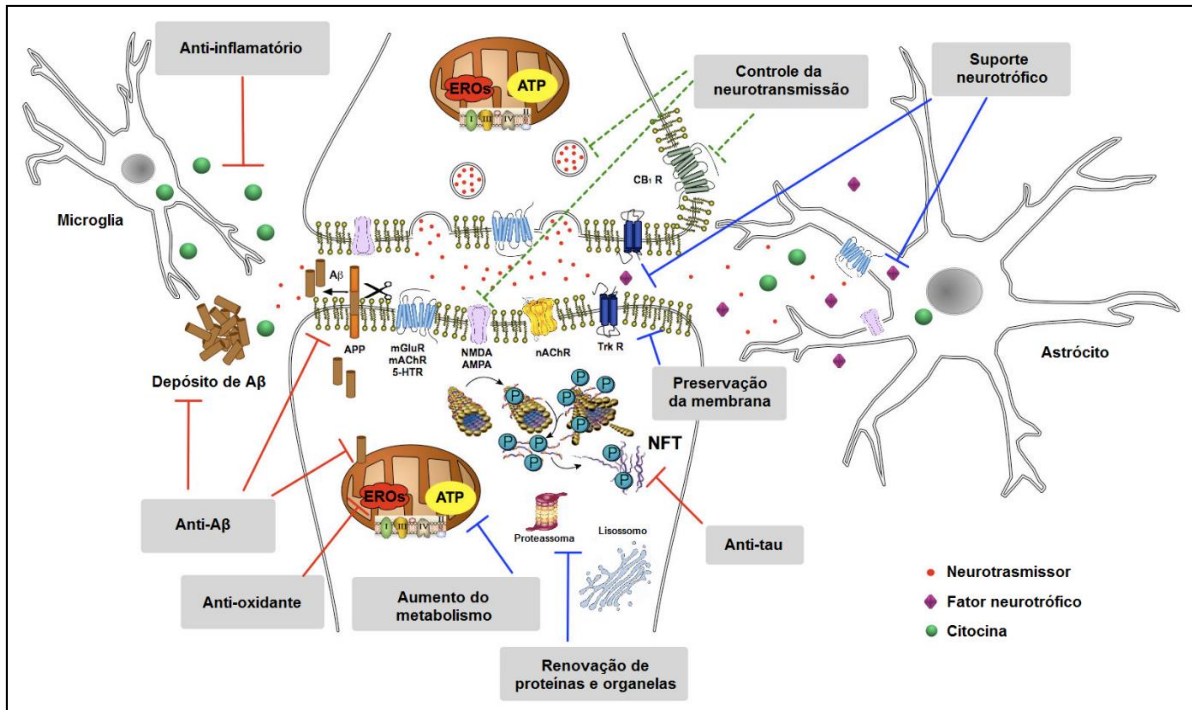


Figura 4. Representação esquemática dos potenciais alvos celulares para prevenir ou retardar a progressão da DA. A maioria das abordagens experimentais é projetada para bloquear ou reduzir (linhas vermelhas) eventos patológicos que ocorrem nos estágios iniciais, incluindo agregação anormal de A β e tau, respostas inflamatórias crônicas e dano por estresse oxidativo. Outras estratégias (linhas azuis) visam estimular o metabolismo a reduzir a insuficiência energética na doença, bem como promover mecanismos de reparo de dano celular, incluindo a plasticidade sináptica, a preservação da membrana celular e a renovação de proteínas e organelas danificadas. Abordagens terapêuticas baseadas na modulação da neurotransmissão (linhas tracejadas verdes) são projetadas para auxiliar neurotransmissão deficiente, e reduzir a excitotoxicidade (ESTER ASO, 2013).

1.3 Modelos experimentais para estudo de DA

Modelos animais são extremamente importantes para o estudo de doenças e potenciais tratamentos. Dentre eles, os modelos murinos estão entre os mais utilizados para pesquisa.

O modelo camundongo propenso à senescência acelerada (SAMP, *senescence-accelerated mouse-prone*) -8 apresenta várias alterações neuropatológicas semelhantes às relatadas na DA. Ele é caracterizado pelo desenvolvimento precoce de déficits cognitivos, processamento alterado de APP e níveis aumentados de A β entre 4 e 12 meses de idade, além de alteração da expressão do gene PSEN, hiperfosforilação da tau e aumento do estresse oxidativo, tornando-o ferramenta valiosa na pesquisa relacionada à DA (MHILLAJ; CUOMO; MANCUSO, 2017).

Devido à grande importância da A β na fisiopatologia da DA, os esforços foram concentrados em tentativas de gerar modelos animais que se assemelham às principais alterações histopatológicas, neuroquímicas e comportamentais observadas em pacientes com DA. Nesse contexto, é bem descrito na literatura, inclusive por nosso grupo, que injeções intracerebrais de peptídeos A β em modelos murinos induzem alterações cognitivas, bioquímicas e histológicas semelhantes às observadas no Alzheimer (BELLOZI et al., 2016; CANAS et al., 2009; CHEN et al., 2010; GIOVANNINI et al., 2002; PASSOS et al., 2010; PREDIGER et al., 2007).

No entanto, modelos de camundongos geneticamente modificados são o padrão ouro para estudo de como a patologia da DA se desenvolve no cérebro, bem como para avaliar e descobrir novos alvos terapêuticos e estratégias modificadoras da doença, pois mimetizam de forma mais semelhante a patologia de seres humanos (MARTINI et al., 2018). A descoberta de causas genéticas da DA decorrentes de herança autossômica dominante permitiu o desenvolvimento de modelos animais transgênicos para a doença (MHILLAJ et al., 2017). As mutações induzem em animais transgênicos o acúmulo do peptídeo A β e/ ou hiperfosforilação da tau, mimetizando a fisiopatologia. Dentre os modelos mais utilizados estão aqueles que expressam mutações na APP, na tau, na PSEN-1 e na APOE4 (GOTZ; ITTNER, 2008; ODDO et al., 2006).

Muitos modelos são transgênicos para apenas um gene, no entanto há modelos transgênicos para mais de um deles (MARTINI et al., 2018). A linhagem de animais Thy1-APPLond/Swe⁺ (T41), a qual foi escolhida para esse estudo, expressa o cDNA humano APP751, contendo as mutações “London (V717I)” e “Swedish (K670M/N671L)” sob controle regulatório do gene Thy1. Como características, os animais apresentam depósitos de A β no córtex frontal, hipocampo, tálamo e bulbo olfatório, além de degeneração sináptica (FAIZI et al., 2012).

1.4 Envolvimento do sistema glutamatérgico na DA

O glutamato é um neurotransmissor excitatório que ativa tanto receptores metabotrópicos quanto ionotrópicos (PIN; DUVOISIN, 1995), sendo responsável por aproximadamente 70% da neurotransmissão excitatória no SNC, particularmente nas regiões corticais e hipocampais (PARSONS et al., 2013). O glutamato medeia a

plasticidade neuronal, transmissão neural, processos de memória e aprendizagem (KENNEDY, 2013).

Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são canais iônicos ativados por ligante, permeáveis aos cátions monovalentes Na^+ e K^+ e, dependendo do subtipo, também ao cátion divalente Ca^{2+} (DANYSZ; PARSONS, 2012). Os três receptores glutamatérgicos ionotrópicos são o receptor de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), o receptor de NMDA e o receptor de cainato. De forma geral, os receptores glutamatérgicos ionotrópicos estão envolvidos na neurotransmissão excitatória rápida (FUNG; HARDAN, 2015).

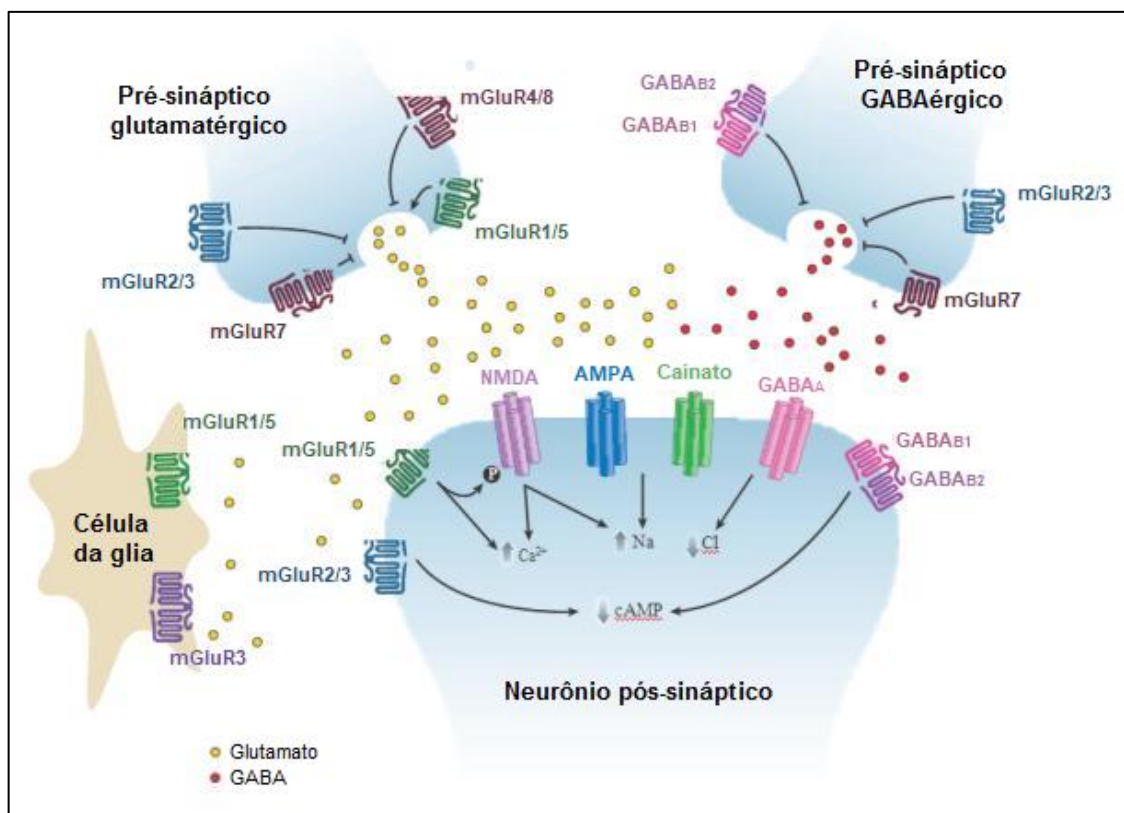


Figura 5. Representação esquemática de mGluRs na sinapse. Em geral, os mGluRs do grupo I estão localizados nos neurônios pós-sinápticos, e os receptores dos grupos II e III estão localizados em terminais pré-sinápticos. Os receptores dos grupos II e III inibem a liberação de glutamato ou GABA, enquanto os receptores do grupo I promovem a liberação quando presentes. No terminal pós-sináptico, os receptores de NMDA, AMPA e cainato respondem ao glutamato com aumentos intracelulares Na^+ ou Ca^{2+} , promovendo a excitabilidade celular. Os mGluRs do grupo I sinalizam via proteínas Gq para aumentar o Ca^{2+} intracelular; adicionalmente, os receptores mGluR5 e NMDA realizam sinalização conjunta, sendo regulados por fosforilação. Os receptores mGluR2 / 3 pós-sinápticos e GABA_{B1} / 2 acoplam-se à inibição de cAMP. Os canais de cloreto de GABA_A modulam o cloreto intracelular. A expressão de mGluR3 e mGluR5 na glia está emergindo como outro sítio chave para a regulação mGluR da atividade sináptica, embora as vias de sinalização e consequências da ativação do receptor nessas células não sejam atualmente bem compreendidas (NISWENDER; CONN, 2010).

Sabe-se que tanto o peptídeo A β 1-42, quanto as placas senis formadas pelo peptídeo, são capazes de aumentar a concentração intracelular de Ca $^{2+}$, evento que está envolvido na neurodegeneração, na disfunção sináptica e no comprometimento cognitivo observado na DA (CAMANDOLA; MATTSON, 2011; LAZZARI et al., 2015; RENNER et al., 2010). Esses eventos estão relacionados com a ativação do receptor de NMDA (ALBERDI et al., 2010; DE FELICE et al., 2007). Há várias potenciais formas de interação entre o peptídeo A β e o receptor de NMDA. O peptídeo pode se ligar diretamente ou através de interações indiretas ao receptor, cuja sinalização pode mediar a atividade de A β em relação à plasticidade e transmissão sináptica e à formação de placas amiloides (KOCAHAN; DOGAN, 2017).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs, *metabotropic glutamate receptors*) são divididos em três grupos, de acordo com o acoplamento do seu segundo mensageiro, a sensibilidade do ligante e a localização sináptica. Os receptores do grupo I (mGluR1 e 5) potencializam predominantemente a liberação pré-sináptica de glutamato e as correntes pós-sinápticas de NMDA, e estão localizados predominantemente em sítios pós-sinápticos. Em contraste, os receptores do grupo II (mGluR2 e 3) limitam a liberação de glutamato, particularmente quando há excesso do neurotransmissor na fenda sináptica, e estão localizados tanto em regiões pré quanto pós-sinápticas. Assim como os receptores do Grupo II, os receptores do Grupo III (mGluR4, 6, 7 e 8) geralmente impedem a liberação excessiva do glutamato, estando presentes predominantemente em neurônios pré-sinápticos (BAUDE et al., 1993; FUNG; HARDAN, 2015; SHIGEMOTO et al., 1993). Os mGluRs possuem papel na modulação da neurotransmissão glutamatérgica excitatória, constituindo potenciais alvos para intervenções farmacológicas. Ademais, os mGluRs possuem importante papel em processos associados com plasticidade sináptica e desenvolvimento neuronal (Figura 5) (SCHWARTZ; ALFORD, 2000).

O mGluR5 (Figura 6), primeiramente descrito em 1992 (ABE et al., 1992), é acoplado à proteína G $_q$, e sua estimulação induz a ativação de fosfolipase C (PLC) e a hidrólise do lipídeo de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) a diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O DAG atua no recrutamento da proteína quinase C (PKC, *protein kinase C*) dependente de Ca $^{2+}$ na membrana, e a transdução de sinal do IP3 ativa receptores do retículo endoplasmático, aumentando os níveis intracelulares de Ca $^{2+}$. O Ca $^{2+}$, por sua vez, também induz a ativação de PKC e de outras proteínas (HAMILTON et al., 2014; KUMAR et al., 2015; MASU et al., 1991;

NICKOLS; CONN, 2014; RITZEN; MATHIESEN; THOMSEN, 2005). Além disso, assim como os demais mGluRs (KUMAR et al., 2015), o mGluR5 está expresso em todo o cérebro, com expressão prevalente no córtex e no hipocampo (ABE et al., 1992; SHIGEMOTO et al., 1993).

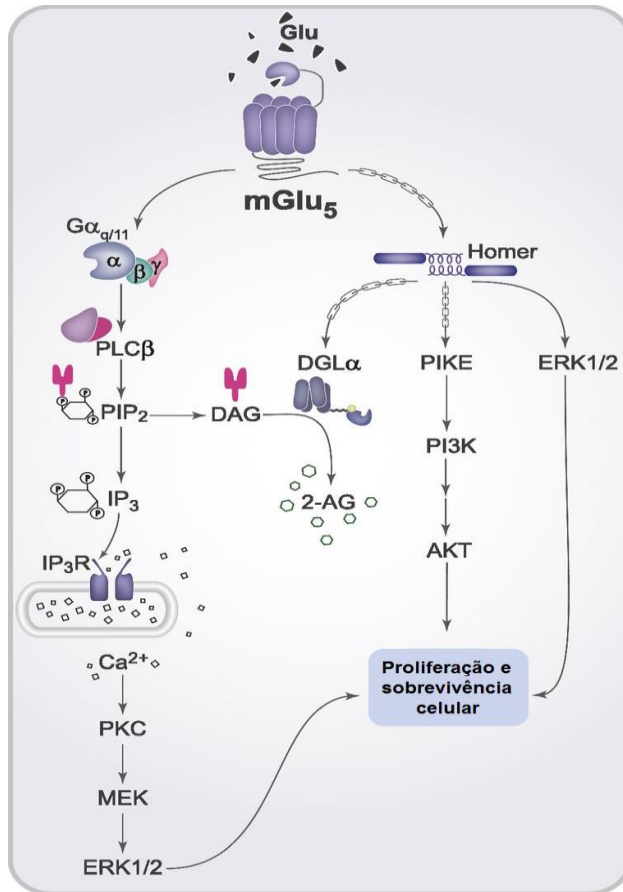


Figura 6. Vias de sinalização celular ativadas pelo receptor mGlu5. Após a ligação do glutamato, o receptor mGlu5 é estimulado e promove a dissociação da proteína G, que ativa a PLC e leva à clivagem do DAG e à formação dos segundos mensageiros IP3 e DAG. O IP3 estimula os receptores de IP3, aumentando os níveis intracelulares de Ca^{2+} e contribuindo para a ativação da ERK1/2. Além disso, a porção C-terminal do mGluR5 pode interagir com proteínas Homer que interagem com outras proteínas parceiras para desencadear várias cascatas biológicas, como a formação do endocanabinóide 2-AG e a fosforilação de AKT e ERK1/2. Além disso, a ativação dessas vias distintas é importante para processos biológicos como proliferação e sobrevivência celular. As interações proteína-proteína são representadas por cadeias de setas e os elementos ativados são representados por setas contínuas (OLMO; FERREIRA-VIEIRA; RIBEIRO, 2016).

Os ligantes alostéricos são substâncias que interagem com um receptor em um sítio diferente daquele do agonista endógeno (Figura 7). Esses ligantes podem exercer eficácia intrínseca na ausência dos ligantes ortostéricos, sendo nesse caso denominados agonistas ou antagonistas alostéricos (RITZEN et al., 2005), ou possuir ação apenas na presença do ligante endógeno ou de um agonista ortostérico, sendo denominados moduladores alostéricos. Dentre eles, existem os moduladores alostéricos positivos (MAPs), moduladores alostéricos negativos (MANs) e moduladores alostéricos silenciosos (MASs) (HAAS et al., 2017; LEA; FADEN, 2006). Os moduladores alostéricos possuem as vantagens de atravessar a barreira hematoencefálica e de maior especificidade em relação ao subtipo de receptor alvo, maximizando os efeitos terapêuticos e minimizando os efeitos adversos (RITZEN et al., 2005). Os MAPs e MANs de mGluR5 afetam a mobilização intracelular de Ca^{2+} mediada por proteína G induzida por glutamato e/ou deslocam a eficácia do glutamato

para ativação do receptor. Em contraste, os MASs não alteram a sinalização de Ca^{2+} basal ou induzida por glutamato (HAAS et al., 2017).

Alterações na sinalização de mGluR5 estão associadas com doenças neurodegenerativas, como Doença de Huntington, Doença de Parkinson e DA (ARIF et al., 2014; LEE, R. K. et al., 1995; RIBEIRO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2010; THATHIAH; DE STROOPER, 2011; UM et al., 2013). Em modelo de síndrome do X frágil, a inibição de mGluR5 é capaz de recuperar déficits cognitivos e alterações bioquímicas encontradas na doença (MICHALON et al., 2012). Em modelos de Doença de Huntington já foi demonstrada a diminuição de déficit cognitivo e das alterações histológicas e bioquímicas associadas às doenças, pela modulação alostérica positiva do receptor (DORIA et al., 2013). E em modelo murino transgênico de DA já foi demonstrada a diminuição da expressão de mGluR5 em áreas do sistema límbico (LEE, M. et al., 2018).

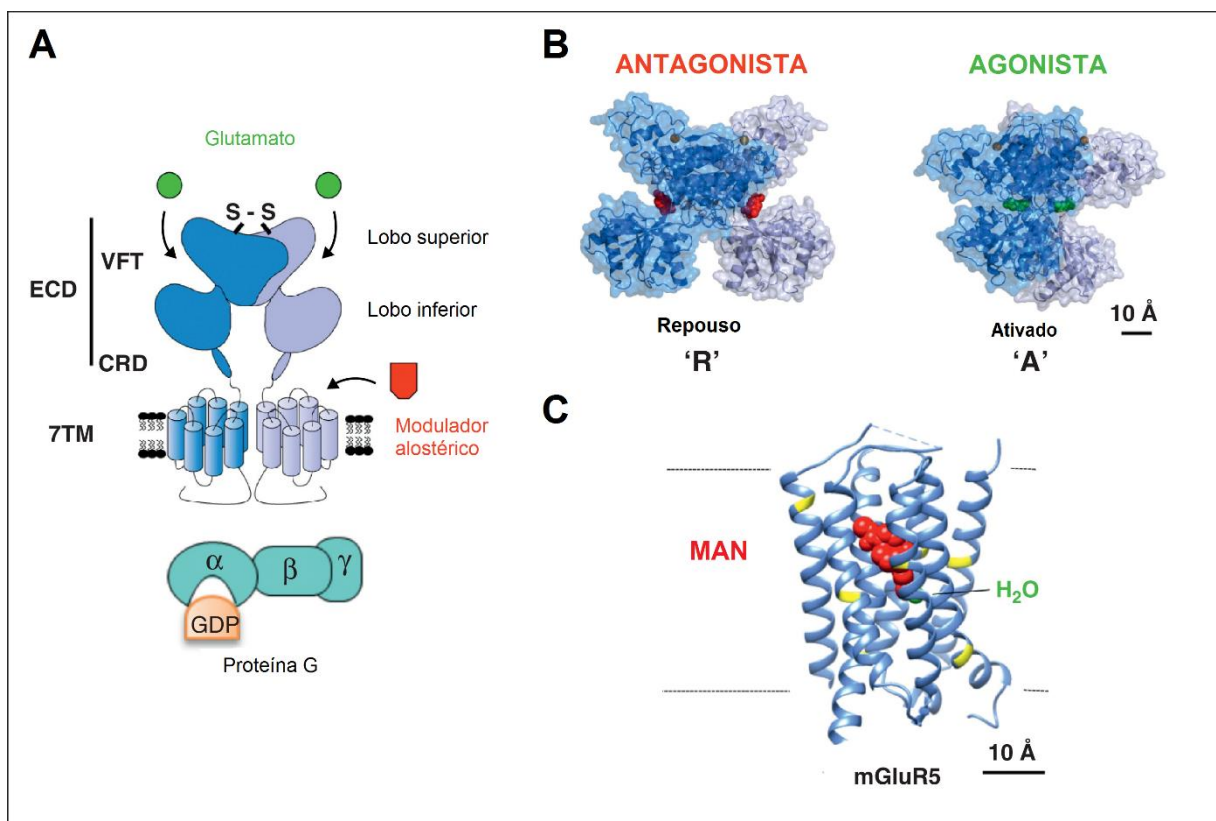


Figura 7. Organização estrutural de mGluRs e estruturas cristalinas dos sítios de ligação isolados. (a) Desenho animado ilustrando um dímero mGluR de tamanho completo estabilizado por uma ponte dissulfeto. (b) dímeros de sítios de ligação no repouso (R; ligado a um antagonista em vermelho) e conformação ativa (A; ligado a um agonista em verde), os dois estados principais de ECD. (c) Estrutura cristalina do domínio transmembrana de mGluR5 em complexo com um MAN específicos (RONDARD; PIN, 2015).

A proteína priônica celular (PrP^c), uma glicoproteína ancorada à membrana, possui alta afinidade pelo peptídeo A β , formando o complexo A β -PrP^c (LAUREN et al., 2009). Tanto a inibição genética quanto a farmacológica da PrP^c previnem a inibição de LTP induzida por A β (BARRY et al., 2011; HAAS et al., 2016; HU, N. W. et al., 2014; LAUREN et al., 2009). Já foi descrito que a PrP^c é necessária não apenas para a redução de LTP, mas também para a diminuição da densidade sináptica, sinaptotoxicidade, déficits cognitivos e mortalidade precoce dependentes de A β (BATE; WILLIAMS, 2011; BRODY; STRITTMATTER, 2018; KUDO et al., 2012; OSTAPCHENKO et al., 2013). O complexo A β -PrP^c induz a ativação do complexo Homer 1b/c-Pyk2-CamKII (HAAS et al., 2016; HAAS et al., 2017) e da quinase intracelular Fyn (UM et al., 2013) via receptor mGluR5, o que induz a fosforilação de NMDAR (LARSON et al., 2012; UM et al., 2012). Já foi descrito que o CTEP, um MAN de mGluR5, previne o declínio cognitivo e o acúmulo de A β em modelo transgênico de DA (HAMILTON et al., 2016) e que o BMS-984923, um MAS de mGluR5, reduz a interação de PrP^c ao mesmo receptor, melhorando déficits cognitivos e a perda sináptica em modelo de DA (HAAS et al., 2017). Além disso, a modulação alostérica silenciosa de mGluR5 reduz déficits cognitivos e a perda sináptica em camundongos transgênicos para a DA (HAAS et al., 2017). No entanto, em animais *knockout* (KO) para mGluR5 há um decaimento mais rápido de correntes sinápticas e redução da força sináptica, demonstrando a importância do receptor para função sináptica (SHE et al., 2009). No que diz respeito à inflamação, já foi demonstrado que sua ativação por agonista reduz a ativação glial, efeito que é perdido em animais KO para o receptor (BYRNES; STOICA; LOANE; et al., 2009); bem como há aumento significativo de microglia nesses animais (CHANA et al., 2015).

Nesse contexto, o desenvolvimento de drogas que se ligam a sítios alostéricos de receptores acoplados à proteína G (GPCRs, *G protein coupled receptors*) para tratamento de distúrbios associados ao SNC é promissor (NICKOLS; CONN, 2014). O 3-Ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il)benzamida (CDPPB; Figura 8) é uma pirazol-5-il-benzamida, pertencente a uma classe de heterociclos de cinco membros que constituem uma classe de compostos particularmente úteis na síntese orgânica. A presença do núcleo de pirazol em diferentes estruturas leva a aplicações em diferentes áreas, possuindo interessantes propriedades farmacológicas e estando presente em drogas pertencentes a diferentes classes terapêuticas (KARROUCHI et al., 2018).

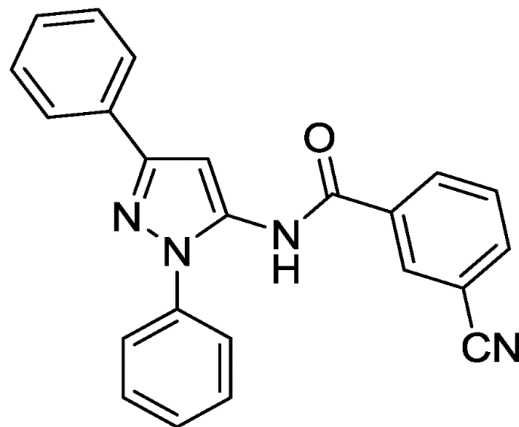


Figura 8. Estrutura química do CDPPB (KARROUCHI et al., 2018).

Recentemente, demonstrou-se que o CDPPB é um modulador alostérico positivo de mGluR5 que atenua a neurotoxicidade induzida por dióxido sulfúrico em células neuronais HT22 (GUAN et al., 2015), potencializa o aprendizado de camundongos C57Bl/6 e ratos Sprague-Dawley no labirinto de Barnes e no labirinto em T, respectivamente (FOWLER et al., 2013), além de possuir atividade anti-inflamatória (XUE et al., 2014). A administração crônica de CDPPB melhora os déficits cognitivos induzidos pelos antagonistas do receptor de NMDA fenciclidina (HORIO; FUJITA; HASHIMOTO, 2013) e MK-801 (USLANER et al., 2009). Além disso, o CDPPB, assim como outros MAPs de mGluR5 (DFB e VU1545), aumenta a fosforilação de proteína quinase B (AKT, *protein kinase B*) e de quinase regulada por sinal extracelular (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*), as quais são vias de sinalização importantes para sobrevivência neuronal (DORIA et al., 2013), reforçando e seu potencial efeito neuroprotetor. Em modelo murino transgênico de Doença de Huntington, o CDPPB aumenta a ativação de vias celulares associadas com sobrevivência celular, previne a morte neuronal e melhora a cognição (DORIA et al., 2015). Apesar de já ter sido demonstrado o potencial para tratamento da DA de MANS e de um MAS de mGluR5, como o receptor possui mais de um local de ligação alostérico, os ligantes podem possuir perfis de sinalização distintos (MOLCK et al., 2014).

Em relação às suas propriedades farmacocinéticas, na dose de 2 mg/Kg em ratos possui tempo de meia-vida de 4,4 horas após administração i.p. e não interage com a glicoproteína P, indicando sua penetração no SNC. Seu metabolismo é realizado por oxidação e glucoronidação da porção difenilpirazol da molécula (KINNEY et al., 2005).

Levando em consideração a necessidade de terapias modificadoras da doença para a DA, que se apresenta atualmente como um problema de saúde pública, a importância da sinalização glutamatérgica em processos de formação de memória, e a busca por novas terapias, bem como que o CDPPB possui um potencial farmacológico neuroprotetor, esse composto se torna um interessante candidato para que tenha seus potenciais benefícios avaliados na terapia da DA. A potencial atividade neuroprotetora dessa molécula pode representar uma terapia promissora para redução da neurodegeneração presente no Alzheimer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar a hipótese que o CDPPB, um modulador alostérico positivo do mGluR5, reduz as alterações neuropatológicas induzidas por A β 1-42 *in vivo* e *in vitro* e em um modelo murino genético de Doença de Alzheimer.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Testar a hipótese de que o CDPPB previne a morte neuronal induzida por A β 1-42 em culturas de neurônios hipocâmpais e que moléculas que medeiam a sobrevivência e a morte neuronal, como ERK 1 e 2, AKT, p38, FOXO3A e BAX são os seus mecanismos de ação;
- ✓ Testar a hipótese de que a injeção intrahipocâmpal de A β 1-42 em camundongos C57Bl/6 induz déficit cognitivo, diminuição da viabilidade neuronal, morte neuronal, gliose, diminuição de BDNF e expressão alterada de citocinas anti- e pró-inflamatórias, e que o CDPPB previne essas alterações;
- ✓ Testar a hipótese de que camundongos transgênicos T41 apresentam déficit cognitivo, gliose, diminuição de viabilidade neuronal, expressão alterada de citocinas anti- e pró-inflamatórias e alterações sanguíneas periféricas, e que o CDPPB previne essas alterações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os experimentos de cultura de células, foram utilizados camundongos C57Bl/6 recém-nascidos provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia. Para os experimentos de cirurgia para injeção de A β , foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6 com idade entre 10 e 12 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Para os experimentos com animais transgênicos T41, foram utilizados camundongos machos e fêmeas com idade de 14 meses. Dois machos foram doados pelo prof. Tony Wyss-Coray e provenientes do biotério do *Glenn Center for Aging* da Universidade de Stanford, EUA, e acasalados com fêmeas C57Bl/6 selvagens (WT, *wild type*) para geração da colônia de animais transgênicos.

Os animais tiveram livre acesso à água e comida, sendo mantidos em ciclo claro/ escuro a cada 12 horas com temperatura local de 22 a 24 °C. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo este projeto aprovado pelos protocolos CEUA n° 159/2012, 226/2015 e 264/2017.

3.2 Drogas

Para a realização do presente estudo, foram usadas as seguintes substâncias: A β 1-42 (Human, Invitrogen, EUA), CDPPB [(3-Cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl) benzamide; Tocris Bioacience, Reino Unido ou droga sintetizada no Laboratório de Síntese Orgânica da UFMG], memantina (Ranbaxy, Espanha), cloridrato de cetamina 10% (Syntec, Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Syntec, Brasil).

3.2.1 Síntese do CDPPB

A preparação do CDPPB foi realizada de acordo com procedimentos previamente descritos (LINDSLEY et al., 2004; SU et al., 2010). Benzoilacetonitrila (2,03 g, 14 mmol, 1 Eq) e fenilhidrazina (1,51 g, 14 mmol, 1 Eq) foram misturadas e agitadas em refluxo por 2 horas, sendo monitoradas por cromatografia de camada

delgada (CCD). Quando a reação foi completada, a mistura resultante foi resfriada, dissolvida em CH_2Cl_2 (40 mL) e agitada em banho de gelo (0 °C). Cloreto de 3-cianobenzil (2,77 g, 16,8 mmol, 1,2 Eq) foi dissolvido em CH_2Cl_2 (25 mL) e lentamente adicionado à mistura a 0 °C sob N_2 , formando um precipitado amarelo. A suspensão resultante foi agitada a 0-10 °C durante 4 horas. Posteriormente, a suspensão foi lavada com água destilada (40 mL) e solução aquosa saturada com NaHCO_3 (2 x 40 mL). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por recristalização em metanol (15 mL, sob refluxo, 2 horas), obtendo o produto como um sólido branco com rendimento de 58% (3 g). A fórmula química do CDPPB é $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$, seu peso molecular é 364,4080 e sua análise elementar é C, 75,81; H, 4,43; N, 15,38; O, 4,39.

3.3 Cultura primária de neurônios hipocampais

Culturas de neurônios foram preparadas a partir da região do hipocampo do cérebro de camundongos C57Bl/6 recém-nascidos com até 2 dias de vida. Após a dissecação do tecido hipocampal, o mesmo foi submetido à digestão com tripsina, seguido por dissociação celular mecânica com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur polida no fogo. As células foram adicionadas ao meio Neurobasal suplementado com N2 e B27, 2,0 mM de GlutaMAX, 50,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina, e 50,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina e em seguida plaqueadas em placas de 4 ou 12 poços previamente preparadas com poli-L-ornitina. As células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO_2 em uma incubadora umidificada e cultivadas durante 10 a 12 dias *in vitro*, com troca de meio a cada 4 dias. É importante ressaltar que estabelecemos previamente que 95% das células nessas culturas são neurônios (DORIA et al., 2013; GEERTS; GROSSBERG, 2006).

3.4 Ensaio de morte celular

Para o ensaio de morte celular, foi utilizado o kit Live/ Dead (Life Technologies). O kit é composto pelos reagentes calceína-AM-AM e homodímero de etídeo-1. O teste se baseia no princípio de que a calceína-AM-AM é permeável à membrana celular, porém, após ser clivada por esterases contidas em células vivas, a mesma se torna incapaz de atravessar a membrana, permanecendo retida dentro da célula e levando

a um aumento da fluorescência verde ao longo do corpo celular. O homodímero de etídeo-1 só é capaz de permear células que apresentem membrana danificada, ou seja, em processo de morte. Após permear a membrana celular, o homodímero de etídeo-1 se liga aos ácidos nucleicos, emitindo fluorescência vermelha.

Os neurônios foram incubados por 20 h na presença de PBS ou A β 1-42 (6,64 μ M), e tratados com DMSO, memantina 30 μ M, ou CDDPB 1 μ M. Após incubação, os neurônios foram marcados com calceína-AM-AM (2,0 μ M) e homodímero de etídeo-1 (2,0 μ M), preparado em solução de PBS 1X por 15 min na incubadora. Após este tempo, os neurônios foram lavados três vezes com PBS 1X.

As fotos foram obtidas por meio do microscópio FLoid®, utilizando o filtro 488 nm para as imagens verdes (calceína-AM-AM) e 633 nm para as imagens vermelhas (homodímero de etídeo-1). Foi considerado um número mínimo de 300 células, vivas ou mortas, contidas em 3 campos analisados por poço, utilizando o software ImageJ. O número de células mortas foi expresso como porcentagem do número total de células.

3.5 Avaliação da ativação de vias de sinalização intracelulares

Para a avaliação da ativação de vias de sinalização intracelulares, foram preparadas novas culturas de neurônios hipocâmpais, conforme descrito anteriormente. Para o processamento das amostras para realização de *western blotting*, 10-12 dias após o cultivo, as culturas primárias de neonatos foram incubadas com HBSS durante 20 min a 37°C. Em seguida, os neurônios foram tratados com HBSS com Ca²⁺ (veículo) ou CDPPB (1 nM), e PBS ou A β (6,64 μ M) pelos tempos de 7,5 ou 15 min a 37 °C. De acordo com o estímulo (PBS ou A β) e o tratamento (veículo ou CDPPB), as culturas foram divididas em 4 grupos: PBS + veículo, PBS + CDPPB, A β + veículo e A β + CDPPB. Os neurônios foram lisados em tampão RIPP (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 140 mM; P-40 1%; deoxicolato de sódio 1% e SDS 0,1%) contendo inibidor de protease (Sigma) e inibidor de fosfatase (Cell Signaling). Após quantificação proteica, 30 μ g do lisado total foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% ou 10%, e em seguida foi realizada a eletrotransferência para membranas de nitrocelulose.

Após bloqueio com albumina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*) ou leite, em tampão tris em salina contendo 0,1% de Tween-20 (TBST) ou 0,1% de Triton

X por 2 horas, conforme especificação do anticorpo, as membranas foram incubadas de acordo com as instruções do fabricantes com anticorpos primários contra fosfo-AKT (1:1000; DB Biotech, 127-0.1), AKT (1:1000; DB Biotech, 126-0.1), fosfo-ERK 1,2 (1:1000; DB Biotech, 013-0.1), ERK 1,2 total (1:1000; DB Biotech, 012-0.1), BAX (1:1000; DB Biotech, 123-0.1), fosfo-FoxO3a (1:1000; Cell Signaling, 5538S), fosfo-p38 (1:1000; Cell Signalling, 5631S), p38 total (1:1000; Cell Signalling, 9212S) e actina (1:2500; Sigma-Aldrich, A5060). Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes e incubadas com o anticorpo secundário adequado, conjugado com peroxidase (anti-coelho, 1:2500, Life Technologies, G21234). Por fim, as membranas foram incubadas com agente quimioluminescente ECL (GE Healthcare). A densidade óptica das bandas detectadas foi quantificada utilizando o software ImageJ. Os resultados foram normalizados pelos níveis de actina ou da respectiva proteína total de cada amostra.

3.6 Cirurgia estereotáxica e microinjeção intrahipocampal de A β 1-42 em C57Bl/6

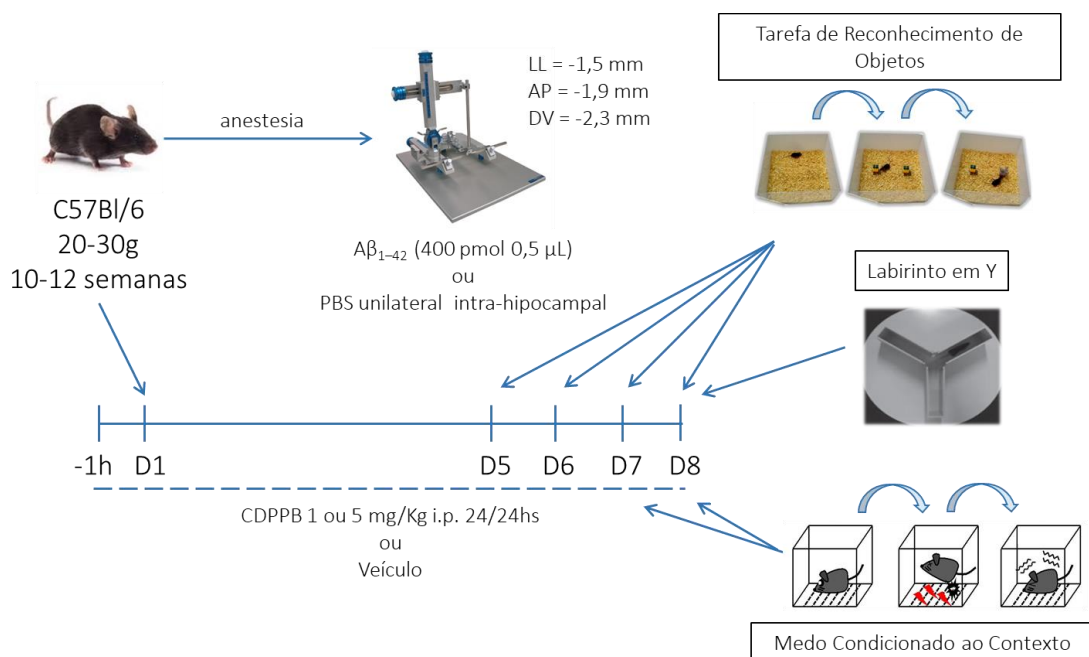
Os animais C57Bl/6 foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), sendo, em seguida, submetidos à tricotomia do escalpo e seu crânio fixado a um aparelho estereotáxico (Insight®). Posteriormente, foi realizada a assepsia do escalpo com álcool iodado e uma incisão sagital para exposição e limpeza da calota craniana. Para microinjeção, uma agulha odontológica gengival 30 G (8 mm) foi introduzida no hipocampo dorsal direito nas coordenadas estabelecidas de acordo com o Atlas Paxinos & Watson (GEORGE PAXINOS, 2001): -1,5 mm médio-lateral, -2,3 mm dorso-ventral e -1,9 mm ântero-posterior em relação ao bregma. A agulha foi conectada a um segmento de polietileno (P10) e este a uma seringa Hamilton® de 10 μ l. As injeções de 400 pmol de A β 1-42 ou PBS foram realizadas com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight®), sendo o volume por sítio injetado 0,5 μ l, a uma taxa de infusão de 1 μ l/min. Após a injeção, a agulha permaneceu no interior do encéfalo do animal por 2 min, para evitar refluxo da droga. Após cada injeção, a bomba de infusão foi novamente acionada, com a finalidade de se verificar se a agulha não estava entupida. Ao término da cirurgia, os animais permaneceram no laboratório até completa recuperação. Após esse período, foram levados ao biotério, onde permaneceram até o término do tratamento e dos procedimentos experimentais.

3.7 Modelos animais

3.7.1 Animais submetidos à cirurgia

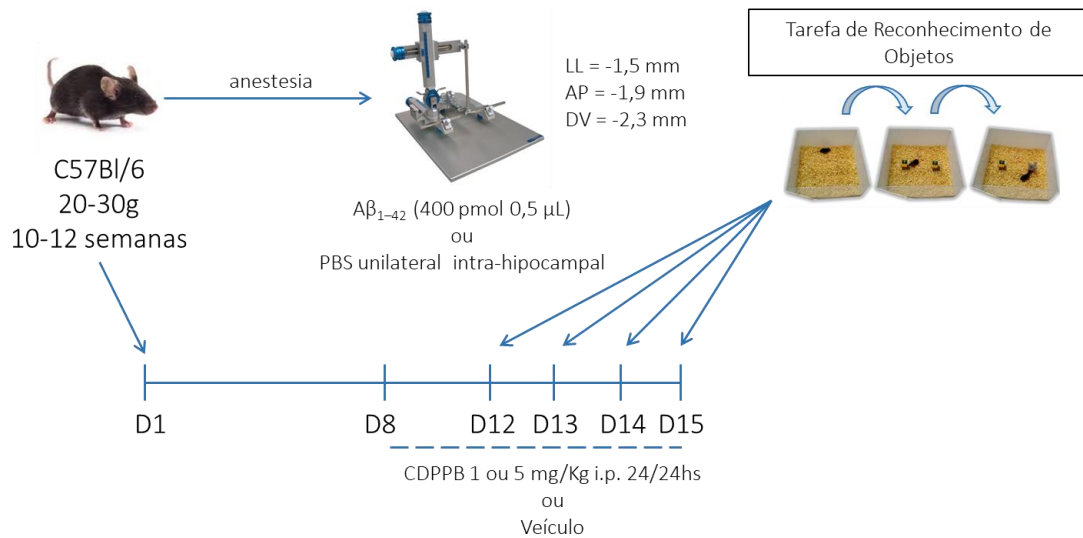
O CDPPB foi administrado nas doses de 1 (CDPPB 1) e 5 (CDPPB 5) mg/Kg, diluído em metilcelulose 5% (Sigma), e administrado por via i.p. Os animais receberam dois diferentes protocolos tratamento.

No protocolo 1, o tratamento foi iniciado 1 hora antes da cirurgia estereotáxica e teve continuidade por mais 7 dias após a mesma, 1 vez por dia e administrado a cada 24 h. Os animais foram pesados todos os dias antes da administração do tratamento. De acordo com a injeção intrahipocampal (PBS ou A β 1-42) e o tratamento (veículo, CDPPB1 ou CDPPB 5), os animais foram divididos em 5 grupos: PBS + veículo, PBS + CDPPB 5, A β + veículo, A β + CDPPB 1 e A β + CDPPB 5.



Esquema 1. Protocolo 1 de cirurgia estereotáxica e tratamento com CDPPB em animais C57Bl/6, com experimentos comportamentais realizados.

No protocolo 2, o tratamento foi iniciado 7 dias após a cirurgia estereotáxica e teve duração de 8 dias, 1 vez por dia e administrado a cada 24 h. Os animais foram pesados todos os dias antes da administração do tratamento. De acordo com a injeção intrahipocampal (PBS ou A β 1-42) e o tratamento (veículo, CDPPB1 ou CDPPB 5), os animais foram divididos em 5 grupos: PBS + veículo, PBS + CDPPB 5, A β + veículo, A β + CDPPB 1 e A β + CDPPB 5.



Esquema 2. Protocolo 2 de cirurgia estereotáxica e tratamento com CDPPB em animais C57Bl/6, com experimentos comportamentais realizados.

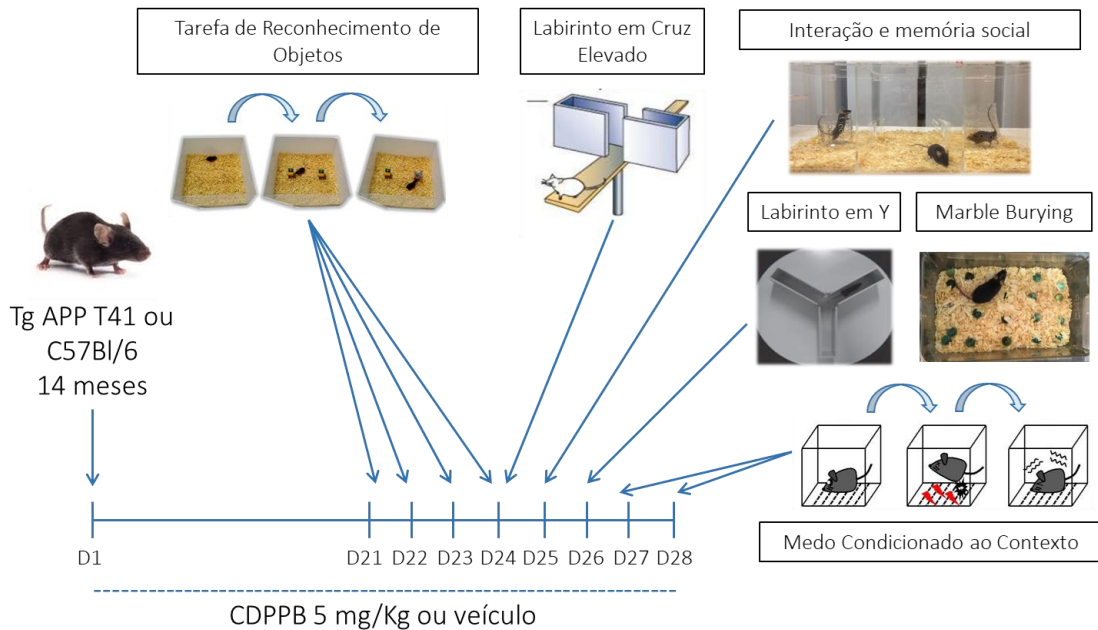
Todos os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos (TRO) para avaliação comportamental, bem como os grupos PBS + veículo, $A\beta$ + veículo e $A\beta$ + CDPPB 5 do protocolo 1 foram submetidos ao teste de medo condicionado ao contexto. Imediatamente após o último experimento, os animais foram sacrificados para obtenção de tecidos e cortes histológicos.

3.7.2 Animais T41

Os animais machos transgênicos T41 foram acasalados com fêmeas WT e foi realizada a genotipagem da prole pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*) para verificar a presença ou ausência do transgene da APP. Uma pequena porção da cauda dos animais foi cortada e a extração de DNA genômico foi realizada com solução SDS 0,2%, NaCl 2,5M 8%, proteinase K 1%, tampão de extração 50X em água de injeção. As amostras foram incubadas a 55°C por 16 horas, centrifugadas a 13.000 RPM por 10 minutos e ao sobrenadante foram adicionados 500 μ L de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas, novamente centrifugadas a 13.000 RPM e o sobrenadante descartado. O sedimento foi homogeneizado com 200 μ L de TE 0,5 X e incubado a 37°C por 1 hora. Para detecção do transgene, foram utilizados os iniciadores (*primers*) para APP senso e antisenso, seguindo as instruções do fabricante. O amplicon com 364 pares de base foi detectado nos animais transgênicos após eletroforese em gel de agarose 2% e revelação por fluorescência.

O CDPPB foi preparado apenas na dose de 5 (CDPPB 5) mg/Kg, diluído em metilcelulose 5% (Sigma), e administrado por via i.p. nos animais com 14 meses de idade.

Animais machos foram submetidos aos seguintes testes para avaliação comportamental: TRO, labirinto em cruz elevado, interação e memória social, labirinto em Y, marble burrowing e medo condicionado ao contexto. Os animais foram tratados por 28 dias e divididos em 4 grupos: WT + veículo, WT + CDPPB 5, T41 + veículo e T41 + CDPPB 5. Imediatamente após o último experimento, os animais foram sacrificados para obtenção de tecidos, coleta de sangue e preparação de cortes histológicos. As fêmeas com 14 meses de idade foram submetidas ao tratamento por 28 dias, e foram sacrificadas para obtenção de tecidos e coleta de sangue.



Esquema 3. Protocolo de tratamento com CDPPB em animais T41 e experimentos comportamentais realizados.

<u>Animais</u>	<u>Protocolo</u>	<u>Grupos</u>	<u>Avaliação Comportamental</u>	<u>Análises histológicas</u>	<u>Dosagem de Citocinas</u>	<u>Western Blot</u>
C57Bl/6	Injeção de A β + tratamento 8 dias (início no dia da cirurgia)	PBS + veículo	X	X	X	X
		PBS + CDPPB 5	X	X		
		A β + veículo	X	X	X	X
		A β + CDPPB 1	X	X		
		A β + CDPPB 5	X	X	X	X
C57Bl/6	Injeção de A β + tratamento 8 dias (início 7 dias após a cirurgia)	PBS + veículo	X		X	
		PBS + CDPPB 5	X			
		A β + veículo	X		X	
		A β + CDPPB 1	X			
		A β + CDPPB 5	X		X	
T41	Tratamento 28 dias	WT + veículo	X	X	X	X
		WT + CDPPB 5	X	X	X	X
		T41 + veículo	X	X	X	X
		T41 + CDPPB 5	X	X	X	X

Tabela 1. Resumo de experimentos realizados com cada grupo de animais experimentais.

3.8 Tarefa de Reconhecimento de Objetos

O protocolo foi iniciado no 4º dia de tratamento, para os animais submetidos à cirurgia; e no 20º dia de tratamento de animais T41 e seus controles, e foi avaliada a memória de longa duração. Os animais foram habituados em uma caixa de acrílico de dimensões 380 x 380 x 150 mm (comprimento x largura x altura), coberta por maravalha, durante 5 min. Nos dois dias subsequentes, foi realizado o pré-teste, em que os animais foram expostos novamente à caixa, na qual foram introduzidos 2 objetos iguais, em diagonal, distando 80 mm das paredes da caixa. Os animais foram mantidos na caixa por 10 min no primeiro dia de pré-teste e 5 min no segundo dia de pré-teste. No dia imediatamente após a segunda exposição aos objetos iguais foi realizado o teste, com a troca de um objeto antigo (OA) por um objeto novo (ON), e exposição por 5 min (BELLOZI et al., 2016; GALANI et al., 1998; MURAI et al., 2007). Ambos o pré-teste e o teste foram filmados e a composição da sala foi mantida a mesma nos 4 dias de experimento. Os objetos foram limpos com álcool 70% entre os testes com cada animal, bem como as fezes de cada roedor foram retiradas da caixa antes do teste seguinte. Os vídeos foram analisados manualmente por meio do

software ANY-maze versão 4.99, por experimentador cego aos grupos experimentais, e o índice de reconhecimento dos objetos foi calculado pela fórmula: $100 * [\text{tempo explorando ON} / (\text{tempo explorando OA} + \text{tempo explorando ON})]$. Também foi calculada a distância percorrida pelos animais.

3.9 Medo condicionado ao contexto

O protocolo foi iniciado no 7º dia de tratamento, para os animais submetidos à cirurgia; e no 27º dia de tratamento de animais T41 e seus controles. Os animais foram habituados por 3 min em uma câmara de condicionamento ao medo, de diâmetros 230 x 200 x 210 mm (comprimento x largura x altura), com o fundo gradeado. Após a habituação, um ciclo de 3 choques de 0,4 mA com duração de 2 s foi aplicado, com início 30 s após o disparo e intervalos de 60 e 40 s. Após o último choque, os animais foram mantidos por 1 min na câmara, antes de serem devolvidos às suas gaiolas. No dia seguinte, os animais foram reintroduzidos na câmara, e o tempo em que permaneceram com postura de congelamento foi contabilizado durante 5 min (ROY et al., 2016).

3.10 Labirinto em Y

O Labirinto em Y é um teste amplamente utilizado para avaliar a memória de trabalho do animal, e consiste em um labirinto em forma de Y, com três braços distintos, simétricos, com angulação de 60º entre eles. Cada braço possui 30 cm de comprimento, 6 cm de largura e 20 cm de altura.

O teste foi realizado no 8º dia de tratamento, para os animais submetidos à cirurgia; e no 26º dia de tratamento dos animais T41 e seus controles. Os animais foram introduzidos no labirinto e puderam explorá-lo livremente durante 8 minutos. A sequência de entrada em cada braço foi registrada por uma câmera. O labirinto foi deixado na mesma posição e os animais foram introduzidos no mesmo braço ao longo de todo o experimento.

O labirinto foi limpo com álcool 70% entre os testes com cada animal. Os testes foram filmados e os vídeos foram analisados por meio do software ANY-maze versão 4.99. Foi calculado o índice de alternâncias, sendo uma alternância quando o animal

alterna em sequência entre os 3 braços do labirinto. A fórmula utilizada foi: $100 * [(n^{\circ} \text{ de alternâncias completas} / (n^{\circ} \text{ entradas nos braços} - 2))]$.

3.11 Interação e memória social

O teste de interação e memória social foi utilizado para avaliar o interesse social e o interesse pelo novo. Foi utilizada uma caixa de acrílico com as medidas de 60 x 40 x 23 cm, composta por três câmaras internas, de mesmo tamanho, comunicando-se uma com as outras através de passagens, a qual pode ser aberta e fechada pelo experimentador.

O teste foi realizado no 25º dia de tratamento de animais T41 e seus controles, e foi avaliada a memória de curta duração. Os animais foram introduzidos na câmara central, com ambas as entradas fechadas, durante 5 minutos, para ambientação. Em seguida, foi introduzido o primeiro animal estranho, juvenil, de mesma linhagem, em uma das câmaras laterais, dentro de um compartimento que não permite sua saída, mas permite contato parcial com o exterior. As passagens foram abertas por 10 minutos, e foi avaliado o interesse do animal teste pela interação com o juvenil. Foi calculada a porcentagem de tempo gasto no compartimento com o animal juvenil, através da fórmula: $100 * [\text{tempo explorando compartimento animal juvenil} / (\text{tempo explorando compartimento vazio} + \text{tempo compartimento animal juvenil})]$. Em seguida, o animal teste foi conduzido ao compartimento central, as passagens fechadas, e foi introduzido um novo animal juvenil estranho, na outra câmara lateral, as passagens foram abertas e foi avaliada a interação do animal teste com ambos os juvenis, por mais 10 minutos. Nesta fase do teste foi avaliada a memória social, uma vez que roedores possuem intrinsicamente interesse pela novidade e são animais extremamente sociáveis. Foi calculada a porcentagem de tempo gasto no compartimento com o novo animal juvenil, através da fórmula: $100 * [\text{tempo explorando compartimento com novo animal juvenil} / (\text{tempo explorando compartimento com animal antigo} + \text{tempo compartimento com novo animal juvenil})]$. Dessa forma, em animais com comportamento normal é esperada interação com o primeiro juvenil, na interação social, e um maior tempo de interação com o novo juvenil inserido na caixa, na avaliação da memória social (NADLER, 2004; KAIDANOVICH-BEILIN, 2011). A caixa foi limpa com álcool 70% entre os testes com cada animal. Os testes foram filmados e os vídeos foram analisados por meio do software ANY-maze versão 4.99.

3.12 Marble burying

O teste de Marble Burying permite avaliar comportamento compulsivo tipo obsessivo e/ ou ansiedade. O teste foi realizado no 26º dia de tratamento de animais T41 e seus controles com 14 meses. Os animais foram colocados em uma caixa com 7 cm de altura de maravalha e 20 bolinhas de gude, na qual permaneceram por 15 minutos. Ao serem retirados, foi avaliado o número de bolinhas de gude que foram parcialmente e completamente enterradas.

3.13 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é utilizado na avaliação do comportamento tipo ansioso dos animais. O labirinto tem forma de cruz, contendo dois braços abertos e dois braços fechados, cada um com 30 cm de comprimento, 6 cm de largura e 20 cm de altura, e posicionado a 1 m do chão. O teste foi realizado no 24º dia de tratamento de animais T41 e seus controles. Os animais foram colocados no labirinto e puderam explorá-lo livremente durante 5 minutos, sendo filmados. O LCE foi limpo com álcool 70% entre os testes com cada animal. Os vídeos foram analisados por meio do software ANY-maze versão 4.99. Foram avaliados o número de entradas e tempo total de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto.

3.14 Coleta de sangue, perfusão intracardíaca e preparo dos cérebros para técnicas histológicas

Após o término dos experimentos comportamentais, um grupo de animais foi anestesiado por via i.p. com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) e, em seguida, foi submetido a uma toracotomia para exposição do coração. Para a coleta do sangue dos animais transgênicos e seus controles, uma agulha hipodérmica foi inserida no ventrículo direito e foi feita a coleta de sangue total. O soro foi separado por centrifugação a 3000 RPM por 15 minutos.

Para a perfusão, uma agulha hipodérmica foi inserida no ventrículo esquerdo, por onde foram administradas as soluções de tampão fosfato em salina (PBS, *phosphate buffered saline*), com o auxílio de uma bomba peristáltica (Insight®), a uma taxa de perfusão de 4 mL/ min. Paralelamente, foi feita uma incisão no arco aórtico

para permitir a saída do sangue. Após a completa a perfusão de PBS, os animais submetidos à cirurgia também foram perfundidos com solução de paraformaldeído (PFA) (Dinâmica) 4%, foram decapitados, os encéfalos retirados com o auxílio de uma espátula e estocados em solução de PFA 4% por 16 horas. Já os animais transgênicos e seus controles não foram perfundidos com PFA 4%, mas apenas com PBS. Em seguida, tiveram seus encéfalos retirados, e apenas o hemisfério direito dos machos foi estocado em solução de PFA 4% por 16 horas.

Posteriormente, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose (Dinâmica) 30% para desidratação das células, até completa saturação, e, em seguida, foram congelados em isopentano (Vetec) 99% e gelo seco (20 s) e estocados a -80 °C.

Os cérebros estocados foram cortados com o auxílio de um criostato (Leica) a -20 °C na espessura de 30 µm ou 60 µm, de acordo com a marcação a ser realizada, e colocados em uma solução crioprotetora [etilenoglicol (Synth) 24%; glicerol (Merck) 24 % NaH₂PO₄ (Dinâmica) 0,1256 %; Na₂HPO₄ (Química Moderna) 0,436 % diluídos em PBS] e estocados a -20 °C.

3.15 Retirada de tecidos para análises bioquímicas

No último dia de tratamento, os tecidos hipocâmpais e corticais dos animais submetidos à cirurgia que não tiveram os encéfalos fixados, foram submetidos à perfusão intracardíaca apenas com PBS, conforme descrito anteriormente, e cuidadosamente dissecados e estocados a -80 °C, até o momento da análise. O mesmo foi feito para o hemisfério esquerdo do encéfalo dos machos T41 e encéfalos das fêmeas T41 e seus controles.

3.16 Estereologia para marcação de NeuN

Foram utilizados cortes de hipocampo de 60 µm dos grupos PBS + veículo, PBS + CDPPB 5, Aβ + veículo, Aβ + CDPPB 1 e Aβ + CDPPB 5 dos animais submetidos à cirurgia e tratados conforme o protocolo 1 e dos animais T41 de 14 meses submetidos ao tratamento e seus controles. As seções de cérebro foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) a 70 °C por 60 minutos para recuperação antigênica, lavados em TBS, imersos por 1 h em solução

de bloqueio (triton 0,5% em BSA 4%), e depois incubados em anticorpo primário anti-NeuN (1:800, EnCor Biotechnology Inc.) por 3 dias a 4 °C. Depois de lavadas, as secções foram incubadas por 16 h em solução contendo anticorpo secundário (cabra anti-coelho, 1:500 em TBS, Vector© Laboratories). Para inativação da peroxidase endógena as secções foram imersas em H₂O₂ a 1% em TBS, lavadas em TBS e depois transferidas para a solução de complexo Avidina-Biotina (VECTASTAIN ABC kit; Vector Laboratories) por 1 h. A marcação foi revelada em solução de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Estereologia

Para a análise estereológica, utilizamos o microscópio óptico Zeiss Apotome.2, do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens ICB/UFMG, com platina motorizada e conversores análogo-digitais para registro digitalizado da informação relativa às coordenadas espaciais (X, Y, Z), permitindo estimativa numérica na tri-dimensão. Esse sistema é acoplado a microprocessador que controla os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (Stereoinvestigator, Microbrightfield©, Williston, VT, USA) e estoca as coordenadas dos pontos de interesse.

Para testar a hipótese de que o tratamento de camundongos T41 com CDPPB diminui a morte neuronal na camada polimórfica do giro denteado do hipocampo, fizemos estimativa numérica de neurônios por meio do método do fracionador óptico, utilizando o programa Stereoinvestigator (Microbrightfield©, Williston, VT, USA). A determinação do número de células foi feita através da distribuição sistemática e aleatória de blocos de contagem, dentro de uma série de secções que continham a região de interesse e foi estimado multiplicando-se o número de células contadas dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra. Esses valores dependem de: 1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções que contem a região de interesse; 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem; e 3) da altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos.

3.17 Marcação com Fluoro-Jade C[®] para avaliação de morte neuronal

Fluoro-Jade C[®] (FJC) é um derivado aniônico da fluoresceína utilizado para marcar neurônios em degeneração (SCHMUED; ALBERTSON; SLIKKER, 1997). Apesar do mecanismo exato de marcação ser desconhecido, diversos estudos demonstram que o FJC é confiável para a marcação de neurônios em degeneração (BAXTER et al., 2015; CROTTI et al., 2014; LIMA et al., 2015; SCHMUED et al., 2005; VITNER et al., 2014). Os cortes de hipocampo de 30 μ m dos grupos PBS + veículo, A β + veículo e A β + CDPPB 5 dos animais submetidos à cirurgia e tratados conforme o protocolo 1 foram lavados em PBS 3 vezes por 30 min, e montados em lâmina gelatinizada. Após secas, as lâminas foram mergulhadas em solução básica de etanol 80 % em NaOH (Química Moderna) 1% por 5 min, etanol 70% por 2 min e lavadas com água destilada por 2 min. Ao abrigo da luz, as lâminas foram incubadas em solução de KMnO₄ (Synth) 0,06% por 20 min, lavadas com água destilada por 2 min e incubadas em solução de FJC (Millipore, Billerica, MA, USA) 0,0001% em ácido acético (Vetec) 0,1% por 20 min. Posteriormente, foram novamente lavadas com água destilada 2 vezes por 1 min e colocadas em estufa 37 °C. Após completa secagem, foram mergulhadas em xilol (Synth) por 1 min e as lamínulas montadas com DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (SCHMUED et al., 2005).

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss) com filtro FITC no aumento de 10 vezes, sendo tiradas fotos da região do giro denteado (GD) dos hipocampos ipsi e contralateral, para quantificação, que foi realizada pela análise da média da intensidade de fluorescência através do software ImageJ.

3.18 Avaliação da expressão de BDNF e de A β por *western blotting*

Os hipocampos dissecados dos grupos PBS + veículo, A β + veículo e A β + CDPPB 5 dos animais submetidos à cirurgia e tratados conforme o protocolo 1 foram utilizados para a dosagem de BDNF. Os tecidos hipocampais e do córtex pré-frontal do hemisfério direito dos animais T41 fêmeas de 14 meses de idade submetidos ao tratamento e seus controles foram utilizados para dosagem de A β . Os tecidos dissecados foram lisados em tampão RIPPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 140 mM; P-40 1%; deoxicolato de sódio 1% e SDS 0,1%). A dosagem de proteínas foi realizada através do ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (BRADFORD, 1976).

Cem µg de proteína foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 20%, para detecção de BDNF, e 30 µg do lisado total foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para detecção de Aβ. Foi realizada a transferência para membranas de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram bloqueadas conforme descrevemos anteriormente e imunizadas pelo tempo descrito pelo fabricante com os seguintes anticorpos primários: anti-BDNF (1:500; Santa Cruz, SC546), anti-Aβ1-40 (1:1000, Cell Signaling, D8Q7I) e anti-actina (1:2500, Santa Cruz). Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes e incubadas com o anticorpo secundário adequado, conjugado com peroxidase (anti-coelho 1:2500, Life Technologies, G21234). Por fim, as membranas foram incubadas com agente quimioluminescente ECL prime (GE Healthcare). A densidade óptica das bandas detectadas foi quantificada utilizando o software ImageJ. Os resultados foram normalizados pelos níveis de actina de cada amostra, e os níveis de expressão do BDNF e da Aβ foram comparados com o controle, que foi normalizado como 100%.

3.19 Microscopia confocal para marcação de células Iba-1⁺, CD68⁺ e de células GFAP⁺

Para a imunomarcação de Iba-1, CD68 e GFAP, foram utilizados os cortes de hipocampo de 60 µm dos grupos PBS + veículo, PBS + CDPPB 5, Aβ + veículo, Aβ + CDPPB 1 e Aβ + CDPPB 5 dos animais submetidos à cirurgia e tratados conforme o protocolo 1; e dos animais T41 de 14 meses submetidos ao tratamento e seus controles. As fatias foram incubadas por 60 min com tampão citrato a 70 °C para recuperação antigênica. Após este período, os cortes foram lavados 3 vezes com tampão tris em salina (TBS) e os sítios inespecíficos foram bloqueados por incubação por 2 horas com solução de bloqueio [4% BSA e 0,5% de Triton-X em TBS]. Em seguida, foram incubados por 3 dias com o anticorpo primário coelho anti-Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* - marcador de micróglia; coelho 1:500, Wako), anti-CD68 (marcador de micróglia ativada, rato 1:500, AbD Serotec) e anti-GFAP (marcador de astrócitos, camundongo 1:800, Cell Signaling). Posteriormente, foram lavados 3 vezes com TBS e incubados com os respectivos anticorpos secundários por 16 horas (cabra anti-coelho Alexa Fluor 555 1:1000, cabra anti-rato Alexa Fluor 488 e cabra anti-camundongo Alexa Fluor 647, Life Technologies). Os cortes foram então lavados 4 vezes com TBS, incubados com DAPI 1,75 µg/ mL por

30 minutos, lavados com TBS mais 2 vezes e montados em lâmina gelatinizada com auxílio do meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich).

As lâminas foram observadas ao microscópio confocal LSM880 (Zeiss) no aumento de 20 vezes, sendo tiradas fotos das regiões *cornus ammonis* (CA) 1 e GD do hipocampo para quantificação de células marcadas. A quantificação foi realizada pela análise da intensidade de fluorescência através do software ImageJ.

3.20 Medidas dos níveis de citocinas no hipocampo

Para as dosagens de citocinas, foram utilizados os tecidos hipocampais e do córtex pré-frontal ipsi e contralateral dos grupos PBS + veículo, A β + veículo e A β + CDPPB 5 dos animais submetidos à cirurgia e tratados conforme os protocolos 1 e 2, bem como o hipocampo e córtex pré-frontal do hemisfério esquerdo dos animais T41 machos de 14 meses de idade submetidos ao tratamento e seus controles. Os tecidos foram devidamente acondicionados e estocados a -80 °C até o momento das dosagens. Para processamento, foram adicionados às amostras 200 μ L de solução inibidora de proteases [NaCl 0,4 M; Tween 20 (Synth) 0,05%; BSA (Inlab) 0,5%; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (Calbiochem) 0,1 mM; cloreto de benzetônio (Vetec) 0,1 mM; ácido etil-diamino-tetra-acético (EDTA) 10 mM; 20 UI de aprotinina (Sigma), diluídos em PBS], para extração de citocinas. As proteínas totais das amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e posteriormente analisadas pelo método CBA (do inglês *cytometric beads array*), utilizando o kit Th1/Th2 para detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, interferon (IFN) - γ , TNF- α , IL-10 e IL-17A (BD). O kit foi utilizado de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante.

3.21 Dosagens sanguíneas de colesterol, triglicérides e enzimas hepáticas

Para a avaliação de colesterol total, triglicérides, fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT), foi utilizado o soro dos animais T41 fêmeas e machos de 14 meses de idade submetidos ao tratamento e seus controles. Após a coleta, o sangue total foi submetido à centrifugação à 3000 RPM por 7 minutos e o soro foi separado para realização das demais dosagens. O colesterol foi dosado através de teste enzimático, utilizando kit Bioclin. Os triglicérides e a FA foram dosados por

ensaio de ponto final, utilizando kit Labtest. A ALT foi dosada por método cinético, utilizando kit Labtest. Os kits foram utilizados de acordo com os procedimentos descritos pelos fabricantes.

3.22 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico GraphPad Prism 6.1. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). O teste para identificação de valores extremos de Grubbs, método ESD, foi aplicado sobre os resultados, e quando identificados valores extremos, estes eram removidos antes da análise. Os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade. Os dados da TRO foram analisados por teste t de uma amostra, comparando as médias com o valor hipotético de 50%. Os dados de experimentos *in vitro* e demais dados de experimentos de animais submetidos à cirurgia estereotáxica, que apresentaram distribuição normal, foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Newmann-Keuls. Todos os dados de peso e os demais dados dos experimentos dos animais T41, que apresentaram distribuição normal, foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste de Newmann-Keuls. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise pelo teste de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Síntese do CDPPB

Foi realizada a caracterização do composto obtido por ponto de fusão, que é sempre uma mesma temperatura quando os compostos se encontram puros; ressonância magnética nuclear de ^1H (^1H RMN) e de ^{13}C (^{13}C RMN), que explora as propriedades magnéticas dos núcleos desses átomos, permitindo detectar o ambiente químico dos mesmos e auxiliando, portanto, na determinação estrutural de moléculas. Obtivemos as seguintes características: ponto de fusão: 204.3-205.7 °C; ^1H RMN (400 MHz, DMSO d_6): δ 10.73 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.19 (d, 1H), 8.09 (d, 1H), 7.92 (d, 2H), 7.76 (t, 1H), 7.66 (d, 2H), 7.50 (m, 4H), 7.38 (m, 2H), 7.02 (s, 1H); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO d_6): δ 164.37, 150.26, 138.71, 136.68, 136.54, 135.58, 134.13, 134.07, 132.69, 132.41, 131.34, 130.03, 129.01, 128.74, 128.11, 127.56, 125.18, 123.37, 118.08, 111.77, 101.36; análise calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$: C, 75.81; H, 4.43; N, 15.38; encontrado: C, 75.39; H, 4.50; N, 15.79. Como a análise elementar encontrada para o CDPPB sintetizado é muito próxima da sua análise descrita na literatura, consideramos que a droga sintetizada possui alto grau de pureza.

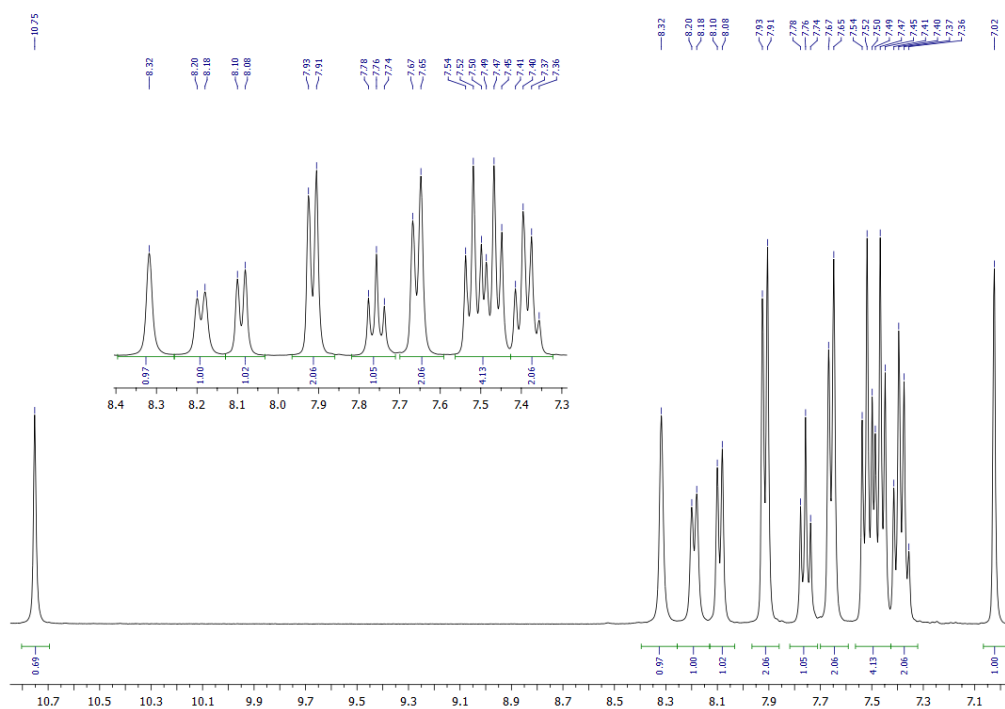


Figura 9. Espectro de hidrogênio de ^1H do CDPPB.

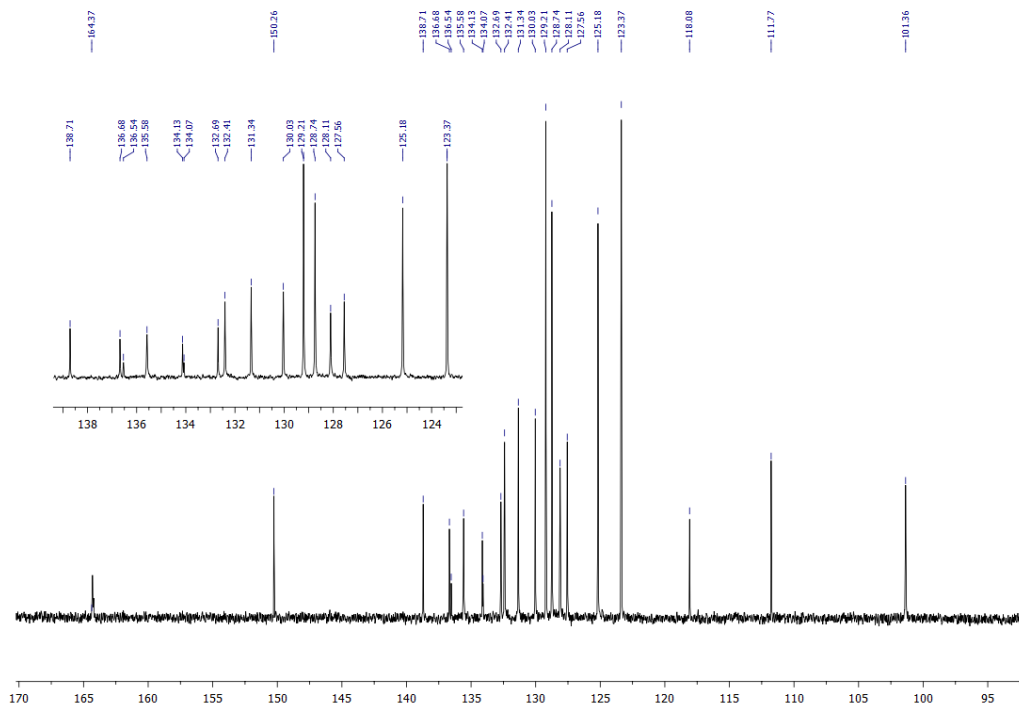


Figura 10. Espectro de carbono de ^{13}C do CDPPB

4.2 Efeitos de CDPPB frente ao estímulo com A β

4.2.1 CDPPB previne a morte neuronal induzida por A β 1-42 em culturas de neurônios hipocampais

Demonstramos anteriormente que o peptídeo A β 1-42 induz morte neuronal *in vitro* (BELLOZI et al., 2016). Nesse estudo, avaliamos os efeitos induzidos *per se* pelo CDPPB e pela memantina, bem como se o CDPPB é capaz de prevenir os efeitos neurotóxicos de A β . Não foi observado aumento significativo na morte neuronal após o tratamento com memantina ou com CPDDB (H=3,800; ns). A β (6,64 μM) induziu aumento significativo da morte neuronal (H=17,99; p=0,003). O tratamento com CDPPB frente ao estímulo com o peptídeo reduziu significativamente a morte neuronal (H=7,884; p=0,003; Figura 11).

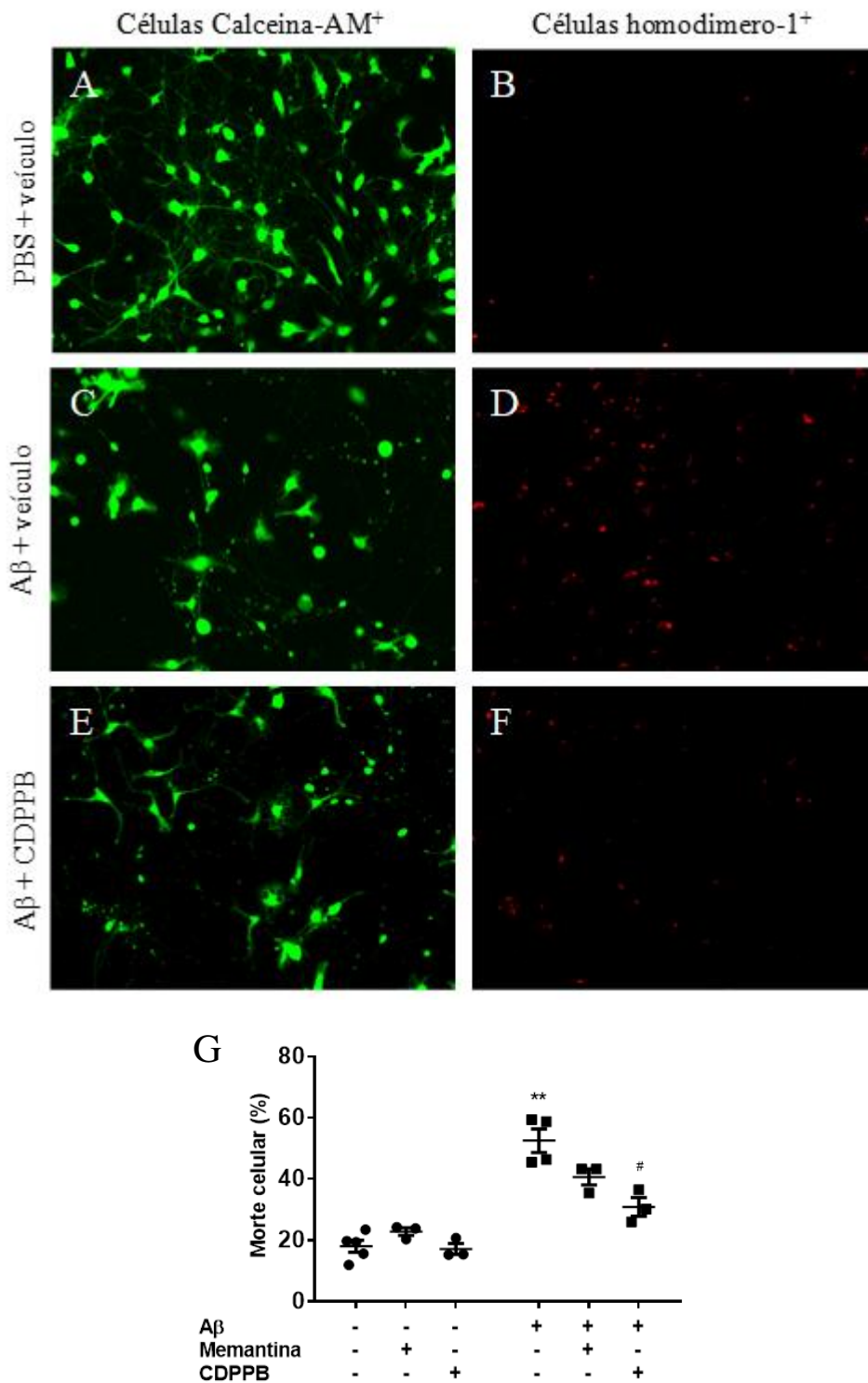


Figura 11. Efeito do CDPPB sobre a morte neuronal induzida por A β 1-42 em culturas de neurônios hipocâmpais. Imagens representativas de calceína-AM e homodímero de etídeo-1 dos tratamentos PBS + veículo (A, B), A β + veículo (C, D) e A β + CDPPB 1 nM (E, F). Gráfico de dispersão dos resultados de quantificação de morte celular nos diferentes grupos (G). Os resultados são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ comparado com o controle; # $p < 0,05$ comparado com as culturas tratadas com A β + veículo (Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn).

4.2.2 Efeito de CDPPB sobre a ativação de vias intracelulares em culturas de neurônios hipocampais

Para investigar o mecanismo de ação neuroprotetor do CDPPB, avaliamos a indução ou inibição de proteínas envolvidas na regulação de vias protetoras e apoptóticas. Para isso, verificamos primeiramente o aumento da fosforilação de ERK, AKT e p38.

O grupo PBS + veículo foi normalizado em 100% de expressão. Apesar de uma tendência de aumento, não houve alteração na fosforilação de ERK 1 7,5 minutos ($H=5,566$; ns) e 15 minutos ($H=6,072$; ns) após o estímulo com A β e tratamento com CDPPB. Também não foi observada alteração significativa na fosforilação de ERK 2 nos tempos de 7,5 ($H=6,072$; ns) e 15 minutos ($H=1,855$; ns; Figura 12).

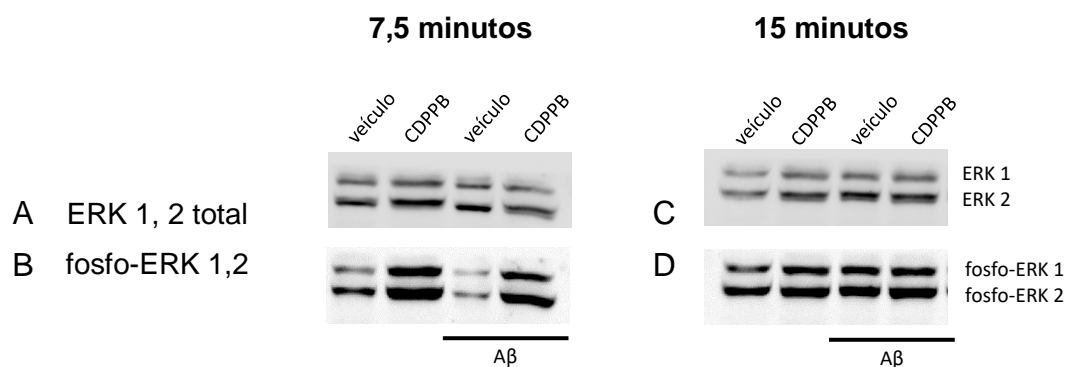


Figura 12. Fosforilação de ERK 1, 2 em cultura de neurônios hipocampais tratadas com CDPPB e A β . Imagens do western blotting de ERK 1,2 total (A, C) e fosfo-ERK 1,2 (B, D) em neurônios hipocampais de culturas primárias que não receberam tratamento ou que foram tratados com A β 6,64 μ M e/ ou CDPPB 1 nM por 7,5 e 15 minutos.

Não observamos alteração na fosforilação de AKT entre os grupos nos tempos de 7,5 ($H=4,915$; ns) e 15 minutos ($H=0,546$; ns), quando comparados entre si e com o controle normalizado em 100% de expressão (Figura 13). O mesmo foi verificado em relação à fosforilação de p38, quando comparamos os grupos nos tempos de 7,5 ($H=3,979$; ns) e 15 minutos ($H=0,754$; ns), quando comparados entre si e com o controle normalizado em 100% de expressão (Figura 14). Os grupos não apresentaram diferença significativa na fosforilação de FoxO3a nos tempos de 7,5 ($H=4,031$; ns) e 15 minutos ($H=4,568$; ns), quando comparados entre si e com o controle normalizado em 100% de expressão (Figura 15). Também não houve alteração na fosforilação de BAX entre os grupos nos tempos de 7,5 ($H=0,858$; ns) e 15 minutos ($H=0,442$; ns; Figura 16).

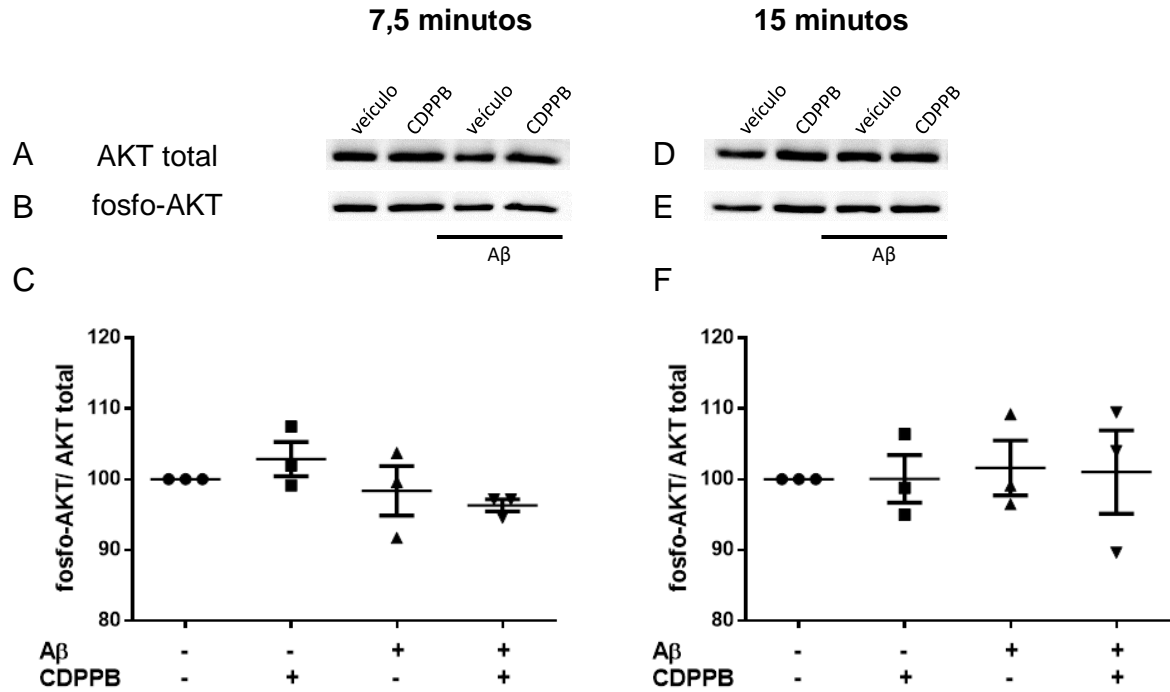


Figura 13. Fosforilação de AKT em cultura de neurônios hipocâmpais tratadas com CDPPB e A β . Imagens do western blotting de AKT total (A, D) e fosfo-AKT (B, E) e gráficos que ilustram a análise densitométrica de fosfo-AKT, normalizados pela expressão de AKT total, em neurônios hipocâmpais de culturas primárias que não receberam tratamento ou que foram tratados com A β 6,64 μ M e/ ou CDPPB 1 nM (C, F) por 7,5 e 15 minutos. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

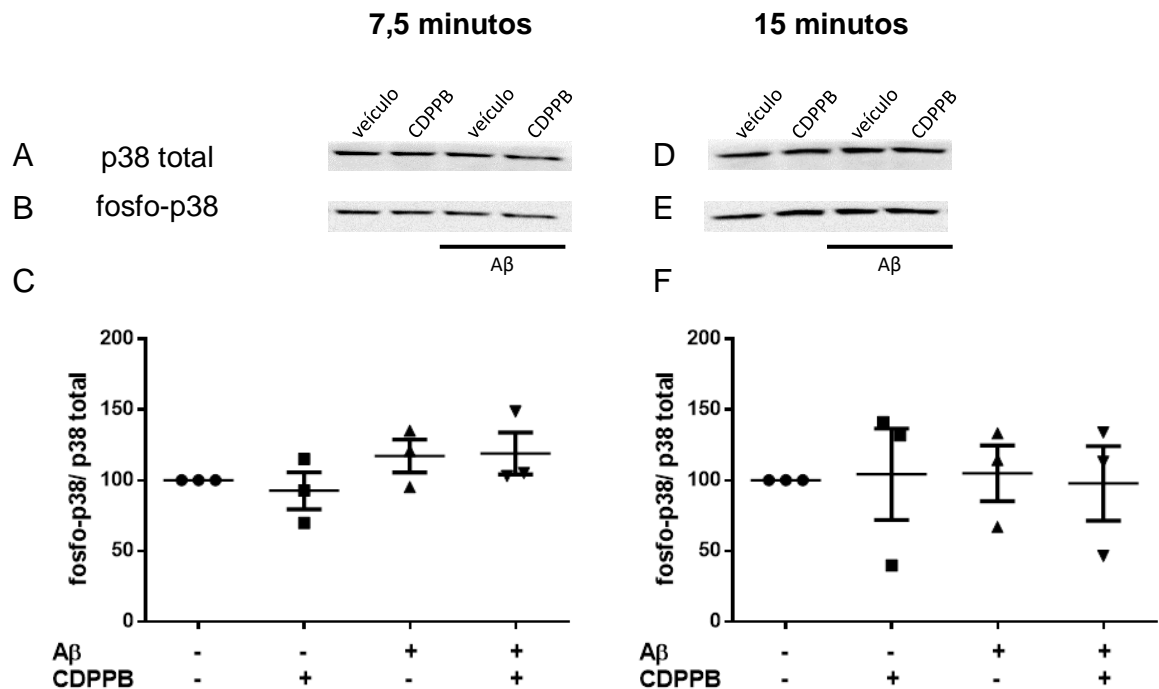


Figura 14. Fosforilação de p38 em cultura de neurônios hipocâmpais tratadas com CDPPB e A β . Imagens do western blotting de p38 total (A, D) e fosfo-p38 (B, E) e gráficos que ilustram a análise densitométrica de fosfo-p38, normalizados pela expressão de p38 total, em neurônios hipocâmpais de culturas primárias que não receberam tratamento ou que foram tratados com A β 6,64 μ M e/ ou CDPPB 1 nM (C, F) por 7,5 e 15 minutos. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

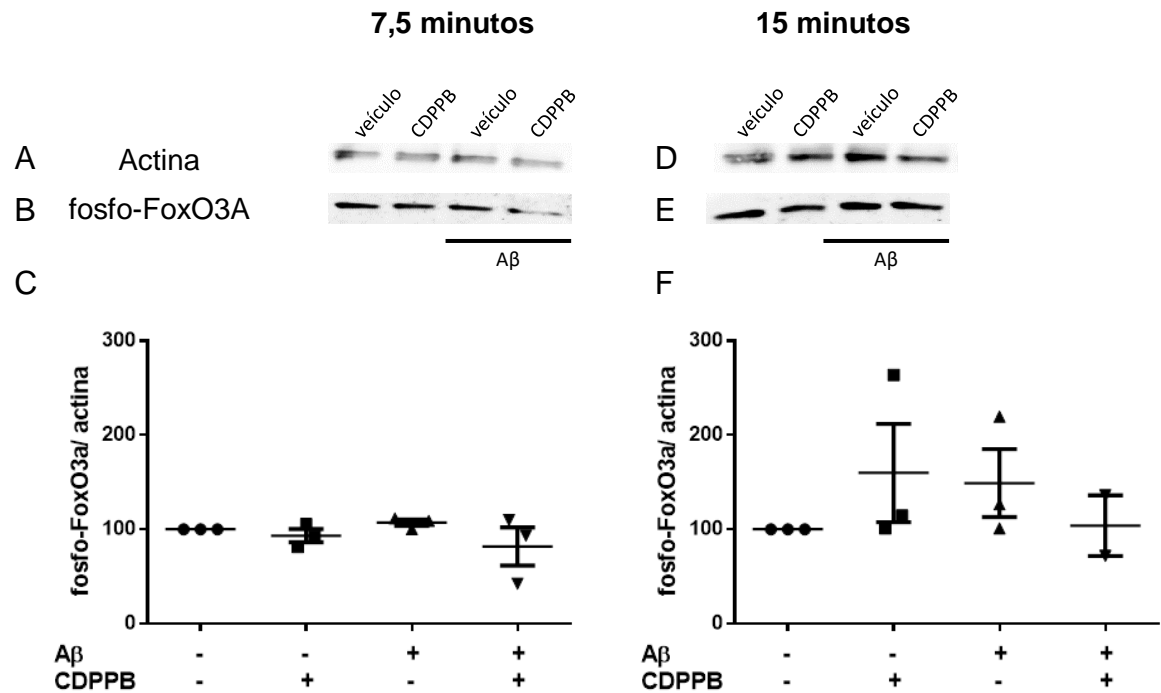


Figura 15. Expressão de fosfo-FoxO3a em cultura de neurônios hipocâmpais tratadas com CDPPB e A β . Imagens do western blotting de actina (A, D) e fosfo-FoxO3A (B, E) e gráficos que ilustram a análise densitométrica de fosfo-FoxO3A, normalizados pela expressão de actina, em neurônios hipocâmpais de culturas primárias que não receberam tratamento ou que foram tratados com A β 6,64 μ M e/ ou CDPPB 1 nM (C, F) por 7,5 e 15 minutos. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

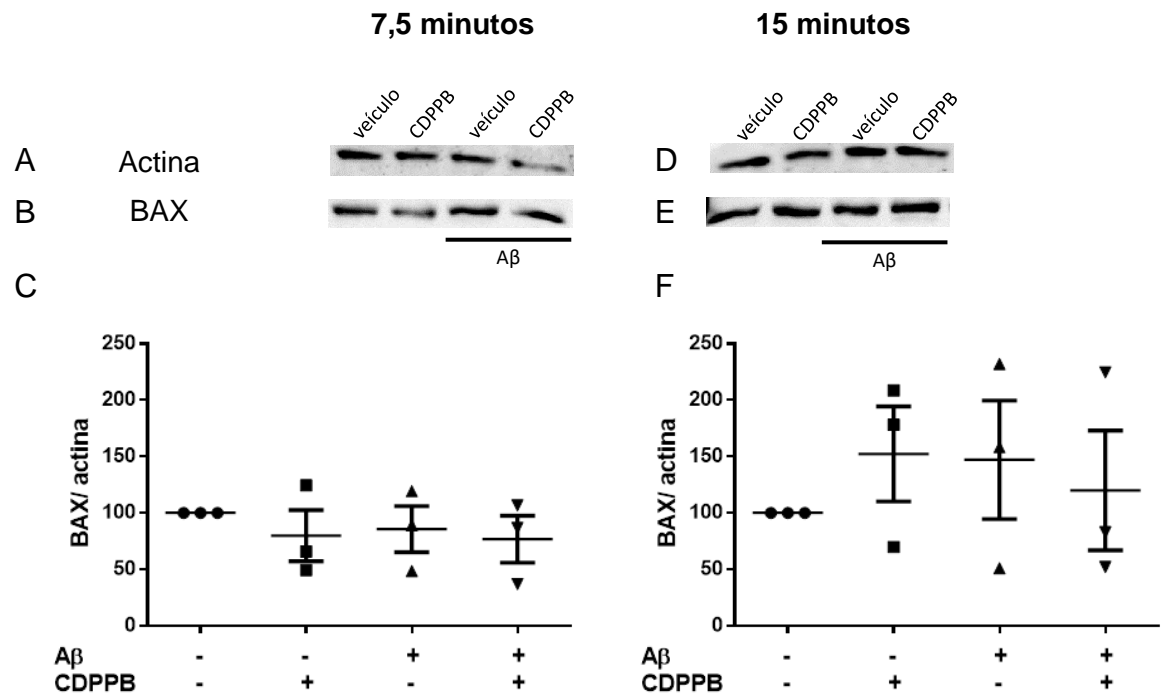


Figura 16. Expressão de BAX em cultura de neurônios hipocâmpais tratadas com CDPPB e A β . Imagens do western blotting de actina (A, D) e BAX (B, E) e gráficos que ilustram a análise densitométrica de BAX, normalizados pela expressão de actina, em neurônios hipocâmpais de culturas primárias que não receberam tratamento ou que foram tratados com A β 6,64 μ M e/ou CDPPB 1 nM (C, F) por 7,5 e 15 minutos. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

4.2.3 CDPPB não altera a massa corporal dos animais ao longo dos dias de tratamento

Considerando a neuroproteção *in vitro* induzida por CDPPB, investigamos seu potencial efeito protetor frente ao estímulo com A β *in vivo*. Todos os animais submetidos à cirurgia foram pesados antes do procedimento e nos dias subsequentes, até o momento do sacrifício. Os animais dos grupos PBS + veículo, PBS + CDPPB 5, A β + Veículo, A β + CDPPB 1 e A β + CDPPB 5 não tiveram alterações significativas de massa (g) ao longo dos dias de tratamento (Figuras 17 e 18).

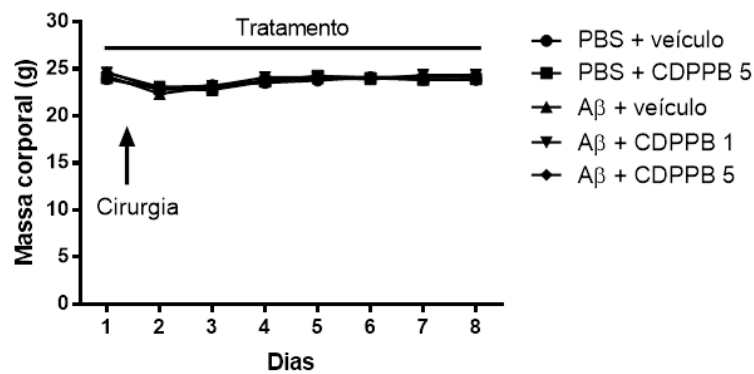


Figura 17. Massa corporal dos animais submetidos à cirurgia para injeção de A β e tratados por 8 dias, com início do tratamento no dia da cirurgia (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman-Keuls).

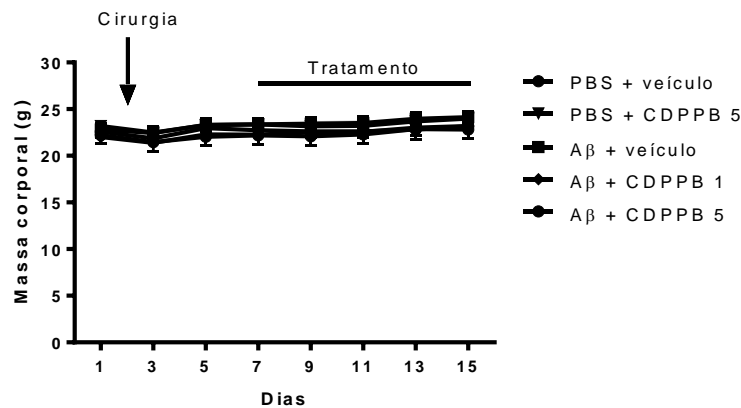


Figura 18. Massa corporal dos animais submetidos à cirurgia para injeção de A β e tratados por 8 dias, com início do tratamento 7 dias após a cirurgia (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2.4 CDPPB previne o déficit de memória induzido por A β 1-42 na TRO

Utilizamos primeiramente a TRO para investigar o efeito do CDPPB nos déficits cognitivos induzidos por A β . No primeiro experimento, em que o tratamento com CDPPB foi iniciado no mesmo dia da cirurgia (protocolo 1 de tratamento), ao comparar o índice de reconhecimento com 50% de exploração do objeto novo, verificou-se que os animais que receberam A β e foram tratados com veículo apresentaram déficit de memória ($t(16)=0,468$; ns) o que não foi observado nos grupos PBS + veículo ($t(14)=2,964$; $p=0,010$) e PBS + CDPPB 5 ($t(3)=3,604$; $p=0,037$). Além disso, o CDPPB, na dose de 5 mg/ Kg, preveniu esse déficit cognitivo ($t(12)=3,068$; $p=0,010$), o que não foi observado na dose de 1 mg/ Kg ($t(3)=0,968$; ns). Não houve diferença na distância total percorrida entre os grupos ($F(4, 48)= 1,080$; Figura 19).

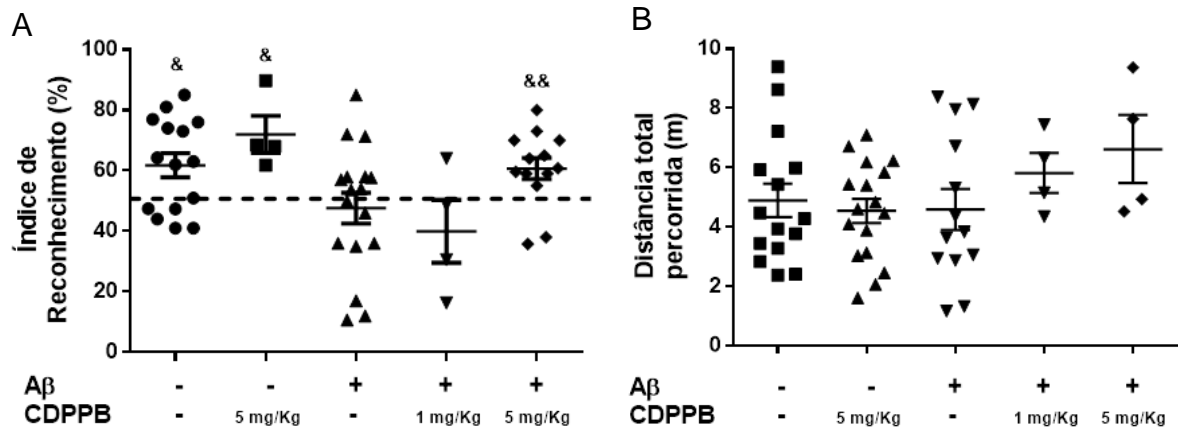


Figura 19. Efeito do tratamento por 8 dias com CDPPB no déficit de memória induzido pela A β na TRO. Tratamento iniciado no mesmo dia da cirurgia. Gráficos de dispersão dos resultados do índice de reconhecimento (A) e da distância total percorrida (B) na tarefa de reconhecimento de objeto. Os resultados são expressos como média \pm EPM. & $p<0,05$ e && $p<0,01$, comparado com 50% (teste t para Índice de Reconhecimento e ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para Distância total percorrida).

No segundo experimento, avaliamos se a droga possui potencial terapêutico, já que o tratamento com CDPPB foi iniciado 1 semana após a cirurgia (protocolo 2 de tratamento). Ao comparar o índice de reconhecimento com 50% de exploração do objeto novo, verificou-se que os animais que receberam A β e foram tratados com veículo apresentaram déficit de memória ($t(11)=1,966$; ns), o que não foi observado nos grupos PBS + veículo ($t(9)=4,685$; $p=0,001$) e PBS + CDPPB 5 ($t(7)=4,307$; $p=0,004$). Além disso, o CDPPB preveniu esse déficit cognitivo nas doses de 1 mg/ Kg ($t(7)=4,155$; $p=0,004$) e 5 mg/ Kg ($t(10)=3,073$; $p=0,012$). Não houve diferença na distância total percorrida entre os grupos ($F(4,44)=0,639$; ns; Figura 20).

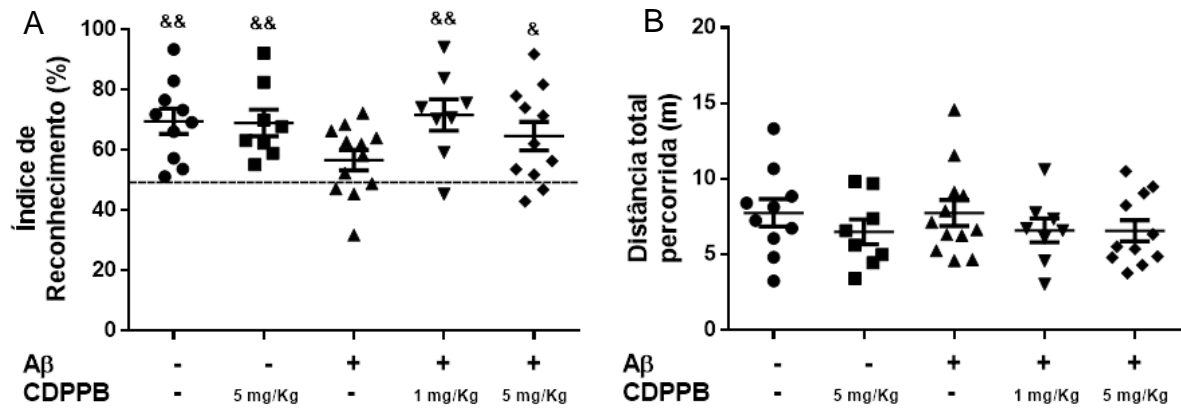


Figura 20. Efeito do tratamento por 8 dias com CDPPB no déficit de memória induzido pela Aβ na TRO. Tratamento iniciado 7 dias após a cirurgia. Gráficos de dispersão dos resultados do índice de reconhecimento (A) e da distância total percorrida (B) na tarefa de reconhecimento de objeto. Os resultados são expressos como média \pm EPM. & $p < 0,05$ e && $p < 0,01$, comparado com 50% (teste t para Índice de Reconhecimento e ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para Distância total percorrida).

4.2.5 CDPPB previne a diminuição do condicionamento ao medo induzido pelo Aβ

Considerando que o CDPPB reduziu o déficit de memória induzido por Aβ na TRO, avaliou-se o efeito do tratamento iniciado no mesmo dia da cirurgia (protocolo 1) em outra tarefa que envolve a função hipocampal, dependente de consolidação de memória, o condicionamento contextual ao medo. Observou-se que o peptídeo diminui o percentual de tempo de congelamento (*freezing*) dos animais, quando comparado com o grupo controle. Além disso, o tratamento com CDPPB preveniu o déficit de memória induzido por Aβ ($F(2,16)=4,736$; $p=0,024$; Figura 21).

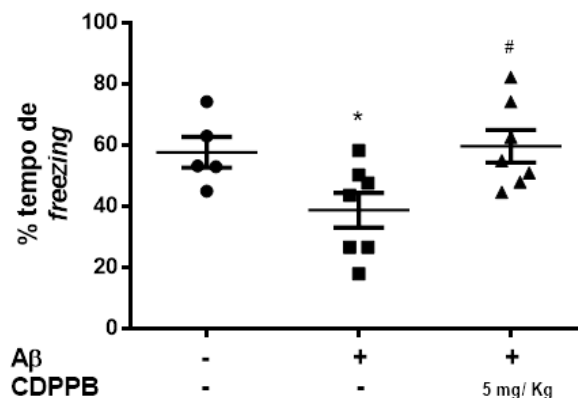


Figura 21. Efeito do tratamento com CDPPB no déficit de memória induzido por Aβ no medo condicionado ao contexto. Gráfico de dispersão do resultado do percentual de tempo de *freezing* no teste de medo condicionado ao contexto. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$, comparado com o grupo PBS + veículo; # $p < 0,05$, comparado com o grupo Aβ + veículo (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2.6 A β não induz déficit cognitivo no labirinto em Y

Avaliamos então a memória de trabalho, que envolve função principalmente cortical, através do índice de alternâncias no labirinto em Y, nos animais cujo tratamento iniciou-se no mesmo dia da cirurgia. Observou-se que o A β e o CDPPB não alteram o índice de alternância dos animais ($F(4,26)=0,298$; ns). Entretanto, o tratamento com CDPPB em animais em que foi injetado A β reduz significativamente o número de entradas nos braços do labirinto quando comparado com o controle e com o grupo injetado com o peptídeo mas não tratado ($F(4,26)=6,824$; $p<0,001$). Quando comparados com o grupo controle, todos os demais grupos também apresentam diminuição da distância total percorrida no labirinto em Y ($F(4,26)=8,449$; $p<0,001$; Figura 22).

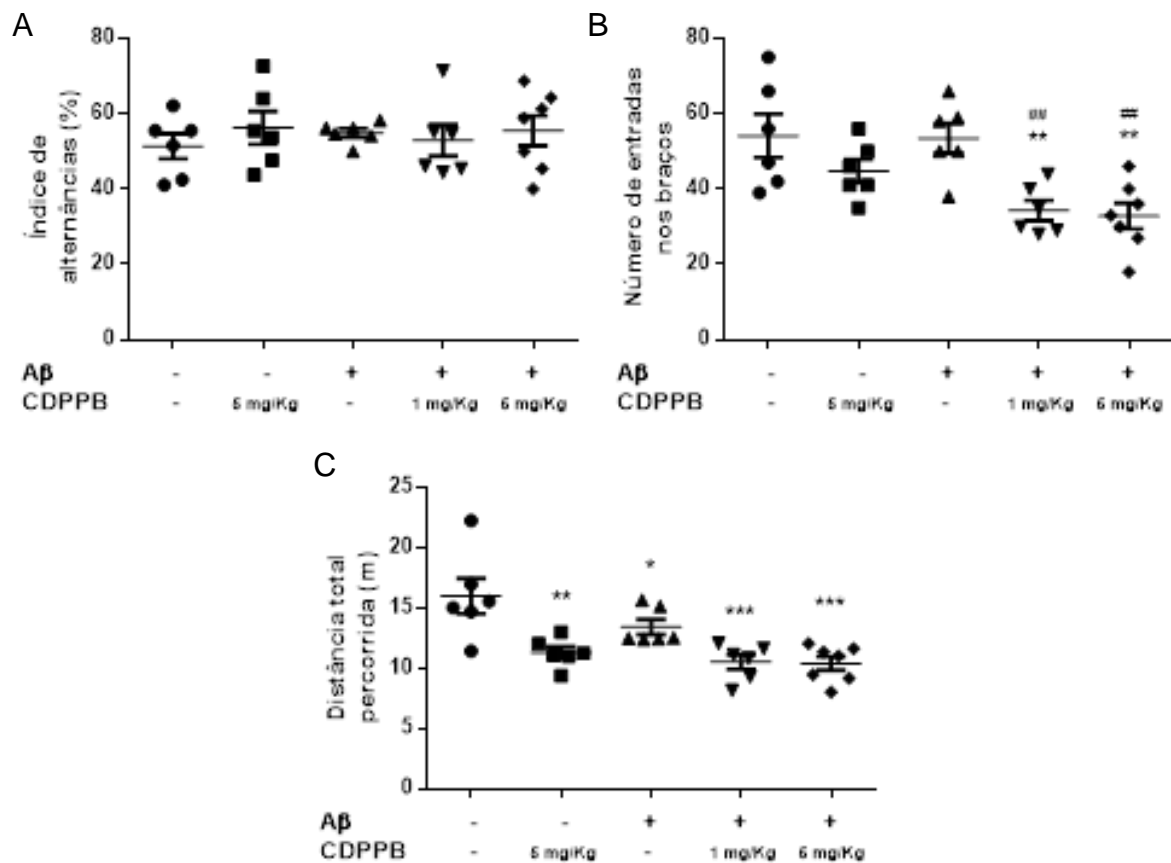


Figura 22. Performance dos animais no labirinto em Y. Gráficos de dispersão do resultado do índice de alternâncias (A), número de entradas nos braços (B) e distância total percorrida (C) no labirinto em Y. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparado com o grupo PBS + veículo; ## $p<0,01$ comparado com o grupo A β + veículo (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2.7 CDPPB reverte parcialmente a diminuição de células NeuN⁺ induzida por A β no GD

Avaliamos em seguida o número de neurônios viáveis na camada polimórfica do GD do hipocampo dos animais, uma das regiões mais afetadas pela neurodegeneração na DA. Observou-se que a A β reduz significativamente o número de neurônios no GD do hipocampo, que o CDPPB na menor dose não previne a perda de neurônios, mas o CDPPB na maior dose previne parcialmente essa perda, já que não é estatisticamente diferente do controle ($F(4,19)=5,937$; $p=0,003$; Figura 23).

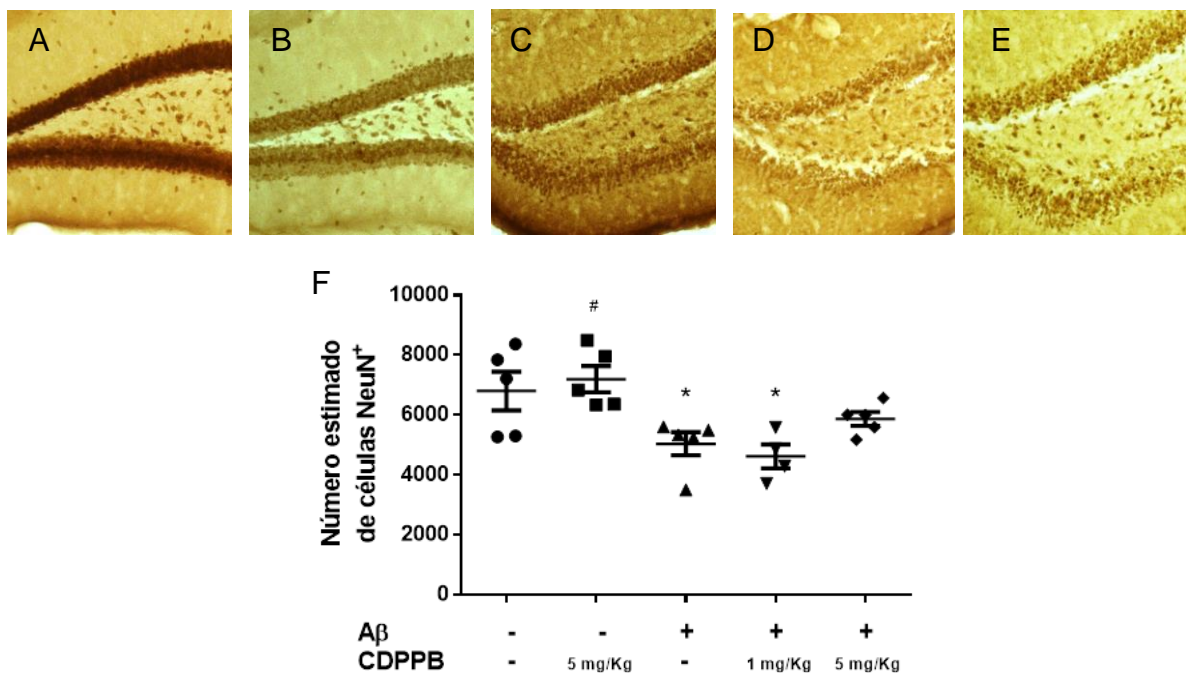


Figura 23. Efeito do CDPPB sobre a viabilidade neuronal após injeção de A β 1-42. Imagens representativas da marcação de células NeuN⁺ no GD do hipocampo em fatias dos grupos PBS + veículo (A), PBS + CDPPB 5 (B), A β + veículo (C), A β + CDPPB 1 (D) e A β + CDPPB 5 (E). Gráfico de dispersão do resultado da quantificação de NeuN nos grupos experimentais (F). Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$, comparados com o controle; # $p<0,05$ comparado com o grupo A β + veículo (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2.8 CDPPB previne a neurodegeneração induzida por A β no GD do hipocampo

Para investigar se o CDPPB previne o prejuízo de memória por meio de redução da morte neuronal induzida pelo peptídeo, efetuamos a marcação das fatias hipocampais com FJC. A injeção intrahipocampal de A β induziu morte neuronal (células FJC⁺; pixels/ μm^2) no GD do hipocampo ipsilateral e o tratamento com CDPPB

na maior dose preveniu esse processo ($F(2,19)=7,616$; $p=0,004$; Figura 24). No GD contralateral houve aumento de neurodegeneração induzida por $A\beta$ e não observamos efeito do CDPPB ($F(2,20)=8,297$; $p=0,002$).

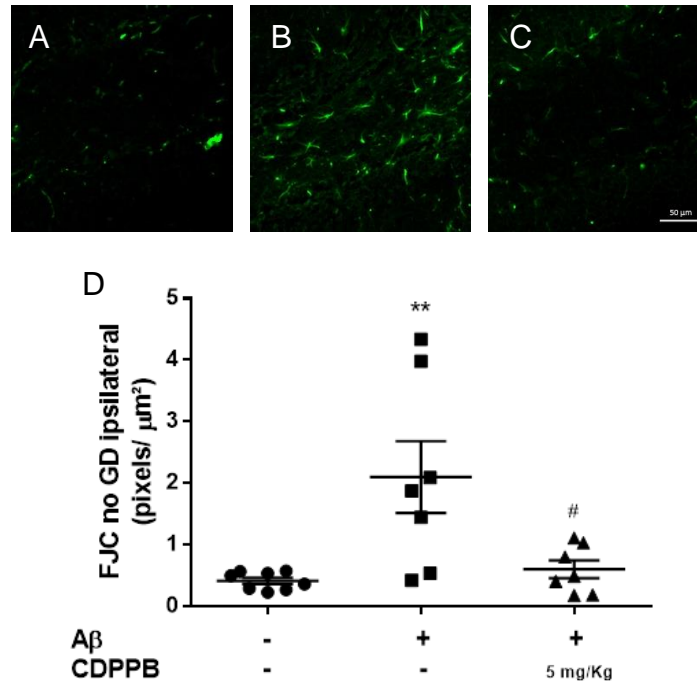


Figura 24. Efeito do CDPPB sobre a neurodegeneração após injeção de $A\beta$ 1-42. Imagens representativas da marcação de FJC no GD do hipocampo em fatias dos grupos PBS + veículo (A), $A\beta$ + veículo (B), $A\beta$ + CDPPB 5 (C). Gráfico de dispersão do resultado da quantificação de FJC nos grupos experimentais (D). Os resultados são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$, comparado com o controle e # $p < 0,05$, comparado com o $A\beta$ + veículo (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2.9 CDPPB aumenta os níveis de BDNF nos hipocampus ipsi- e contralateral

Considerando-se o papel neuroprotetor das neurotrofinas, investigamos se a neuroproteção induzida por CDPPB poderia ocorrer em decorrência de um aumento nos níveis do BDNF (pg/mg de proteína). No hipocampo ipsilateral a $A\beta$ não alterou os níveis de BDNF, mas o CDPPB aumentou os níveis da neurotrofina em relação ao grupo controle e ao injetado com o peptídeo ($F(2,15)=25,08$; $p < 0,0001$). No hipocampo contralateral, houve diminuição de BDNF no grupo injetado com $A\beta$ e aumento dos seus níveis pelo tratamento com CDPPB ($F(2,12)=47,17$; $p < 0,0001$; Figura 25).

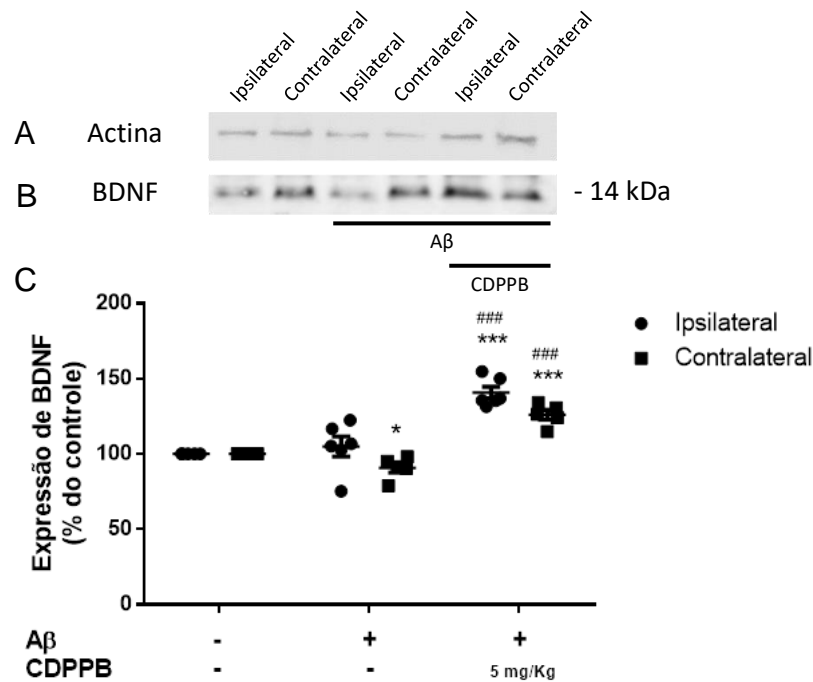


Figura 25. Efeito do CDPBB na expressão de BDNF após a injeção de A β . Imagens representativas do western blotting de actina (A) e BDNF (B) e gráfico de dispersão que ilustra a análise densitométrica de actina e BDNF (C) dos hipocampos ipsilateral e contralateral dos diferentes grupos de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$, comparado com o grupo PBS + veículo; ### $p < 0,001$ comparado com A β + veículo (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2.10 Efeito do CDPBB sobre a ativação da micróglia e astrocitose

A microgliose foi avaliada por imunomarcção de Iba-1 e de CD68 e a astrocitose pela imunomarcção com GFAP. Não houve alteração da área marcada por Iba-1 no GD ($F(4,18)=1,602$; ns) e em CA1 ($F(4,20)=0,579$; ns) do hipocampo ipsilateral, e no GD ($F(4,20)=1,035$; ns) e CA1 ($F(4, 19)=2,447$; ns) do hipocampo contralateral, quando comparamos os grupos. Não houve marcação de CD68 nos hipocampos desses animais.

Também não observamos diferenças significativas na marcação de GFAP no GD ($F(4,18)=1,509$; ns) e CA1 ($F(4,20)=0,578$; ns) do hipocampo ipsilateral e no GD ($F(4,20)=1,174$; ns) e CA1 ($F(4,19)=2,447$; ns) do hipocampo contralateral (Figura 26).

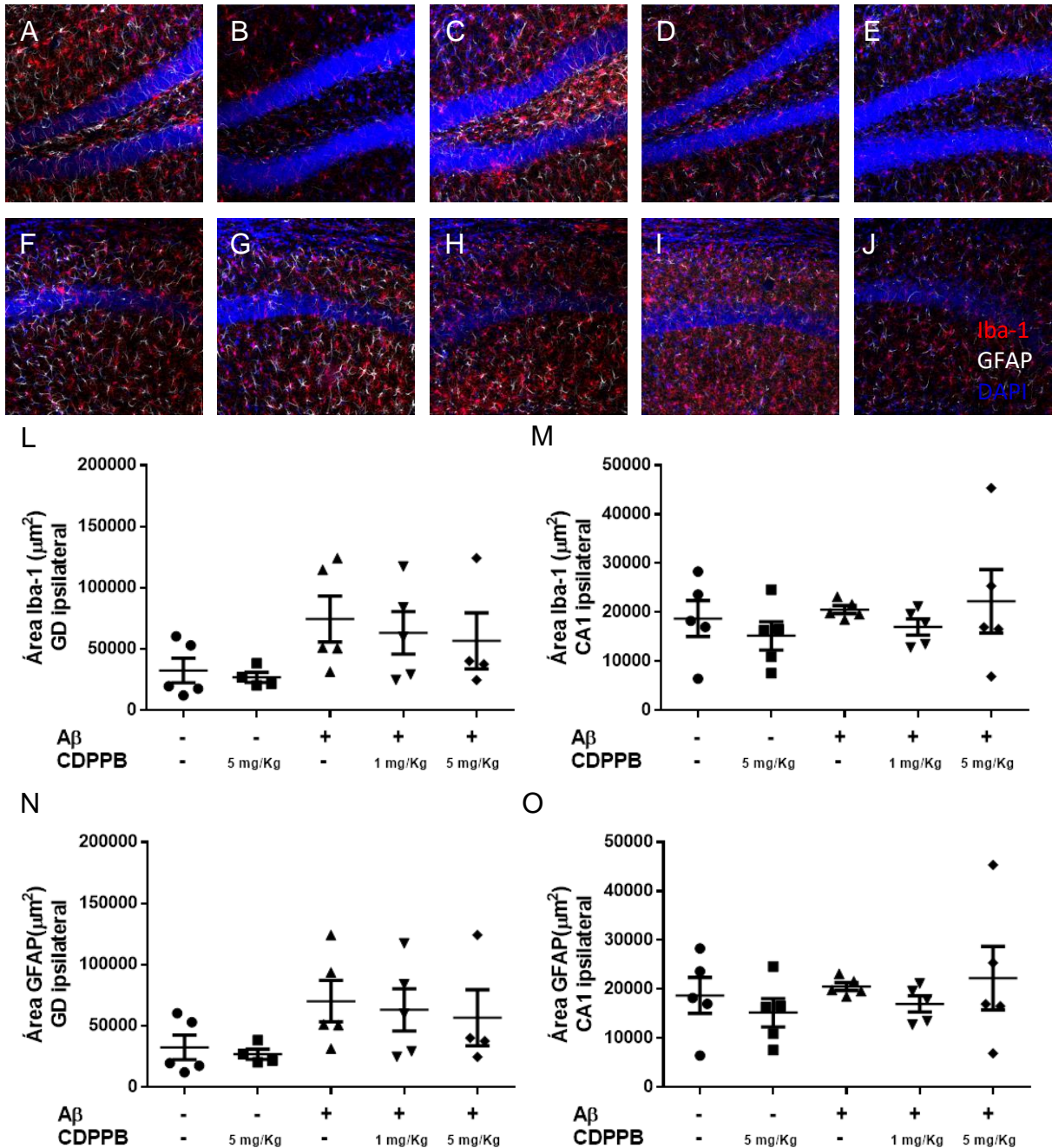


Figura 26. Efeito do CDPPB sobre a expressão de Iba-1 e GFAP no hipocampo ipsilateral em animais submetidos à cirurgia para injeção de Aβ tratados ou não com CDPPB. Imagens representativas da imunomarcagem no GD e em CA1 dos grupos PBS + veículo (A, F), PBS + CDPPB 5 (B, G), Aβ + veículo (C, H), Aβ + CDPPB 1 (D, I) e Aβ + CDPPB 5 (E, J). Gráficos de dispersão da quantificação no GD e em CA1 de Iba-1 (L, M) e GFAP (N, O) nos grupos experimentais (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2.11 Efeito do CDPPB sobre citocinas anti e pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal de animais que foram injetados com A β

Nos animais em que o tratamento foi iniciado no mesmo dia da cirurgia (protocolo 1), a citocina IL-2 estava diminuída no hipocampo contralateral dos animais do grupo A β + CDPPB 5 quando comparada com o grupo PBS + veículo ($p < 0,05$), assim como a IL-6, quando comparada com os grupos PBS + veículo ($p < 0,01$) e A β + veículo ($p < 0,01$) e IL-17A, quando comparada com o grupo PBS + veículo ($p < 0,05$). Houve redução da IL-10 no hipocampo ipsilateral dos grupos A β + veículo ($p < 0,05$) e A β + CDPPB 5 ($p < 0,01$) quando comparada com o grupo PBS + veículo (Tabela 2). Não houve alteração na concentração das citocinas desses animais no córtex pré-frontal nas comparações individuais entre os grupos (Tabela 3).

Nos animais em que o tratamento foi iniciado 1 semana após a cirurgia (protocolo 2), houve redução da IL-10 no hipocampo ipsilateral dos grupos A β + veículo ($p < 0,05$) e A β + CDPPB 5 ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo PBS + veículo (Tabela 4). Não houve alteração na concentração das citocinas desses animais no córtex pré-frontal (Tabela 5).

Hipocampo		Análise estatística da concentração de citocina (pg/mg de proteína)	
Citocina	Lado	F ou H	p
IL-2	Ipsilateral	F(2,14)=1,763	ns
IL-2	Contralateral	H=5,916	0,044
IL-4	Ipsilateral	F(2,14)=2,205	ns
IL-4	Contralateral	F(2,13)=3,008	ns
IL-6	Ipsilateral	F(2,14)=3,859	0,046
IL-6	Contralateral	F(2,13)=9,750	0,003
IFN- γ	Ipsilateral	F(2,14)=4,003	0,042
IFN- γ	Contralateral	H=2,241	ns
TNF- α	Ipsilateral	F(2,14)=3,569	ns
TNF- α	Contralateral	F(2,14)=0,176	ns
IL-17A	Ipsilateral	F(2,14)=0,606	ns
IL-17A	Contralateral	H=6,191	0,023
IL-10	Ipsilateral	F(2,14)=6,904	0,008
IL-10	Contralateral	F(2,13)=3,002	ns

Tabela 2. Análise estatística da concentração de citocinas nos hipocampus ipsi e contralateral dos animais submetidos ao protocolo 1 de tratamento (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para variáveis paramétricas e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para variáveis não paramétricas).

Córtex pré-frontal		Análise estatística da concentração de citocina (pg/mg de proteína)	
Citocina	Lado	F ou H	p
IL-2	Ipsilateral	H=6,183	0,047
IL-2	Contralateral	F(2,14)=1,325	ns
IL-4	Ipsilateral	F(2,14)=2,636	ns
IL-4	Contralateral	F(2,14)=1,190	ns
IL-6	Ipsilateral	F(2,14)=0,037	ns
IL-6	Contralateral	F(2,14)=0,736	ns
IFN- γ	Ipsilateral	H=4,987	ns
IFN- γ	Contralateral	F(2,14)=0,558	ns
TNF- α	Ipsilateral	F(2,14)=2,035	ns
TNF- α	Contralateral	F(2,14)=0,407	ns
IL-17A	Ipsilateral	F(2,14)=0,373	ns
IL-17A	Contralateral	F(2,14)=1,515	ns
IL-10	Ipsilateral	F(2,14)=0,497	ns
IL-10	Contralateral	F(2,14)=1,372	ns

Tabela 3. Análise estatística da concentração de citocinas no córtex pré-frontal ipsi e contralateral dos animais submetidos ao protocolo 1 de tratamento (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para variáveis paramétricas e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para variáveis não paramétricas).

Hipocampo		Análise estatística da concentração de citocina (pg/mg de proteína)	
Citocina	Lado	F ou H	p
IL-2	Ipsilateral	F(2,12)=0,840	ns
IL-2	Contralateral	H=2,773	ns
IL-4	Ipsilateral	F(2,12)=0,797	ns
IL-4	Contralateral	F(2,12)=0,345	ns
IL-6	Ipsilateral	H=0,698	ns
IL-6	Contralateral	F(2,12)=0,106	ns
IFN- γ	Ipsilateral	H=1,978	ns
IFN- γ	Contralateral	F(2,12)=1,227	ns
TNF- α	Ipsilateral	F(2,12)=0,292	ns
TNF- α	Contralateral	H=1,543	ns
IL-17A	Ipsilateral	H=0,042	ns
IL-17A	Contralateral	F(2,12)=2,887	ns
IL-10	Ipsilateral	F(2,12)=4,837	0,029
IL-10	Contralateral	F(2,12)=1,837	ns

Tabela 4. Análise estatística da concentração de citocinas nos hipocampos ipsi e contralateral dos animais submetidos ao protocolo 2 de tratamento (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para variáveis paramétricas e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para variáveis não paramétricas).

Córtex pré-frontal		Análise estatística da concentração de citocina (pg/mg de proteína)	
Citocina	Lado	F ou H	p
IL-2	Ipsilateral	F(2,12)=1,842	ns
IL-2	Contralateral	F(2,12)=0,038	ns
IL-4	Ipsilateral	F(2,12)=0,415	ns
IL-4	Contralateral	H=0,005	ns
IL-6	Ipsilateral	H=0,986	ns
IL-6	Contralateral	H=1,385	ns
IFN- γ	Ipsilateral	H=0,500	ns
IFN- γ	Contralateral	H=0,095	ns
TNF- α	Ipsilateral	F(2,12)=0,233	ns
TNF- α	Contralateral	F(2,12)=0,040	ns
IL-17A	Ipsilateral	F(2,12)=1,059	ns
IL-17A	Contralateral	F(2,12)=1,623	ns
IL-10	Ipsilateral	F(2,12)=1,459	ns
IL-10	Contralateral	F(2,12)=0,046	ns

Tabela 5. Análise estatística da concentração de citocinas no córtex pré-frontal ipsi e contralateral dos animais submetidos ao protocolo 2 de tratamento (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para variáveis paramétricas e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para variáveis não paramétricas).

4.3 Avaliação de animais transgênicos T41 e dos efeitos de CDPPB

4.3.1 Genotipagem dos animais T41 e seus controles

Os animais transgênicos apresentaram reação positiva na região de 364 pares de base, o que não foi observado para os animais WT. Os animais com genotipagem positiva foram utilizados como animais APP e os animais com genotipagem negativa foram utilizados como controles (Figura 27).

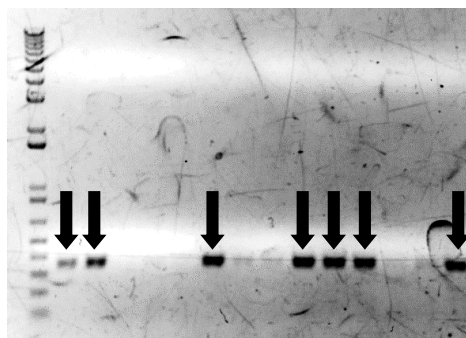


Figura 27. Imagem representativa de gel de agarose com bandas positivas para o transgene APP.

4.3.2 CDPPB não altera a massa corporal dos animais ao longo dos dias de tratamento

Os animais T41 de 14 meses foram pesados no primeiro dia e a cada 3 dias durante os 28 dias de tratamento. Os animais dos grupos WT + veículo (n=5), WT + CDPPB 5 (n=5), T41 + Veículo (n=8) e T41 + CDPPB 5 (n=7) não tiveram alterações significativas de massa (g) ao longo dos dias de tratamento (Figura 28).

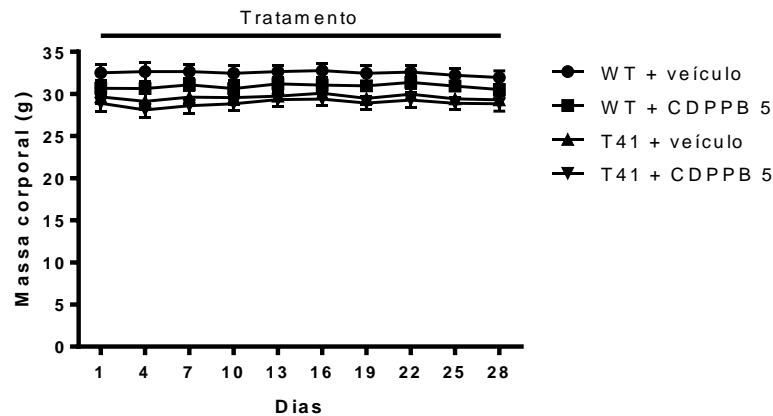


Figura 28. Massa corporal dos animais T41 de 14 meses de idade e seus controles, submetidos ao tratamento com CDPPB 5 mg/Kg ou seu veículo por 28 dias (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.3.3 CDPPB não previne o déficit de memória em animais T41

Devido ao comprometimento cognitivo na DA, avaliamos a memória na tarefa de reconhecimento de objetos. Os animais transgênicos com 14 meses foram tratados por 28 dias com CDPPB 5 mg/Kg. Nessa idade, foi detectado déficit cognitivo nos animais T41 tratados com veículo ($t(7)=1,052$; ns) e com CDPPB ($t(6)=0,206$; ns), quando comparados com 50% de reconhecimento; enquanto os animais WT tratados com veículo ($t(4)=5,015$; $p=0,07$) e com CDPPB ($t(4)=3,741$; $p=0,020$) apresentaram memória normal. Os animais T41 tratados com CDPPB apresentaram diminuição da distância total percorrida quando comparados com os animais WT tratados com CDPPB. Não houve alteração na distância total percorrida após tratamento com CDPPB nos animais WT [fator tratamento vs genótipo ($F(1,21)=2,47$; ns), fator genótipo ($F(1,21)=6,26$; $p=0,021$) e fator tratamento ($F(1,21)=0,33$; ns); Figura 29].

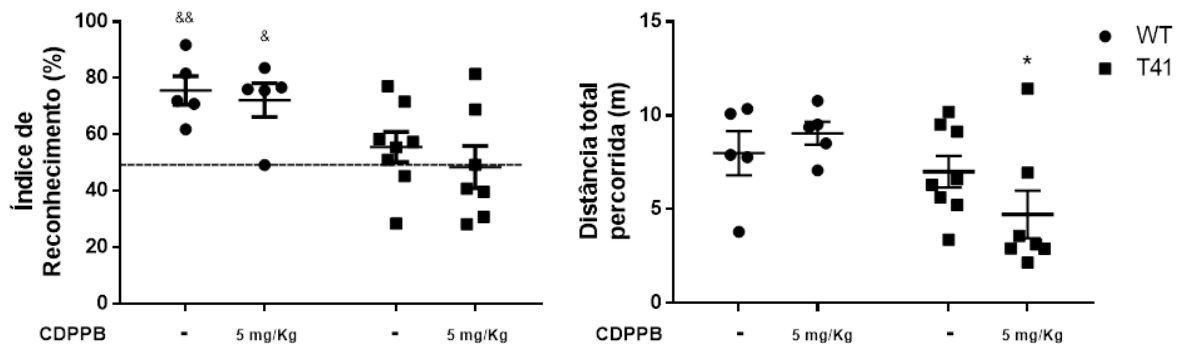


Figura 29. Índice de reconhecimento de objetos dos animais T41 e controles com 14 meses de idade tratados com CDPPB ou seu veículo. Gráficos de dispersão dos resultados do índice de reconhecimento (A) e da distância total percorrida (B) na tarefa de reconhecimento de objeto. Os resultados são expressos como média \pm EPM. $^{\&\&}p < 0,01$, comparado com 50%; $^{\&}p < 0,05$ e $^*p < 0,05$ comparado com o grupo WT + CDPPB (teste t para Índice de Reconhecimento e ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls para Distância total percorrida).

4.3.4 Não há condicionamento ao medo em animais T41 ou alteração induzida por CDPPB

Como o condicionamento contextual ao medo também é um teste que envolve a atividade hipocampal, os animais foram submetidos ao teste. Não houve condicionamento ao medo dos animais transgênicos com 14 meses de idade e não foi observado efeito do CDPPB sobre esse comportamento nos animais [fator tratamento vs genótipo ($F(1,21)=0,20$; ns), fator genótipo ($F(1,21)=1,59$; ns) e fator tratamento ($F(1,21)=1,75$; ns); Figura 30].

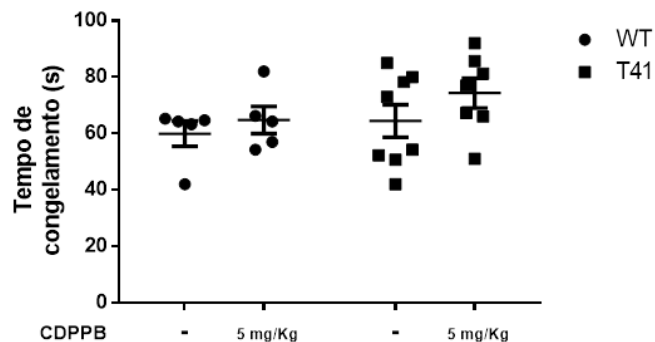


Figura 30. Medo condicionado ao contexto de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade tratados com CDPPB ou seu veículo. Gráfico de dispersão do resultado do percentual de tempo de congelamento. Os resultados são expressos como média \pm EPM (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.5 Não há alteração do comportamento dos animais T41 no labirinto em Y

O labirinto em Y detecta a integridade da memória de trabalho. Os animais T41 de 14 meses de idade não apresentaram diferença significativa no índice de alternâncias [fator tratamento vs genótipo ($F(1,20)=0,030$; ns), fator genótipo ($F(1,20)=1,620$; ns) e fator tratamento ($F(1,20)=0,200$; ns)], no número de entradas [fator tratamento vs genótipo ($F(1,20)=0,210$; ns), fator genótipo ($F(1,20)=0,550$; ns) e fator tratamento ($F(1,20)=0,780$; ns)] e na distância percorrida [fator tratamento vs genótipo ($F(1,20)=0,090$; ns), fator genótipo ($F(1,20)=0,000$; ns) e fator tratamento ($F(1,20)=0,886$; ns)] no labirinto em Y (Figura 31).

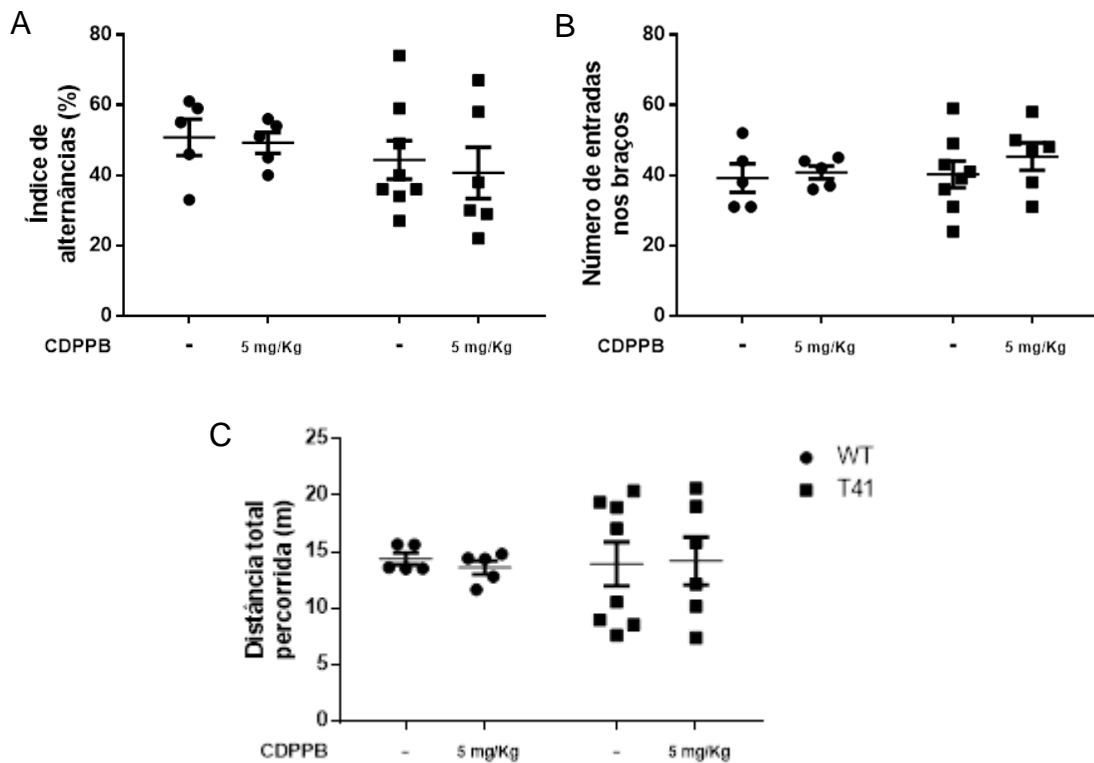


Figura 31. Índice de alternância no labirinto em Y de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade tratados com CDPPB ou seu veículo. Gráficos de dispersão do resultado do índice de alternâncias (A), número de entradas nos braços (B) e distância total percorrida (C) no labirinto em Y. Os resultados são expressos como média \pm EPM (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.6 Não há alteração da interação e da memória social em animais T41, mas o CDPPB aumenta a interação social em camundongos T41

Com a DA, há também o isolamento social, e a medida de interação social dos animais é importante avaliação de presença de outra alteração cognitiva. Não houve diferença estatística entre a porcentagem do tempo de interação com o animal juvenil no teste de interação social entre os animais WT e T41 de 14 meses de idade tratados com veículo. No entanto, o CDPPB aumentou a porcentagem de tempo de interação dos animais T41 com o animal juvenil em relação aos demais grupos [fator tratamento vs genótipo ($F(1,21)=8,517$; $p=0,008$), fator genótipo ($F(1,21)=7,101$; $p=0,015$) e fator tratamento ($F(1,21)=0,808$; ns); Figura 32].

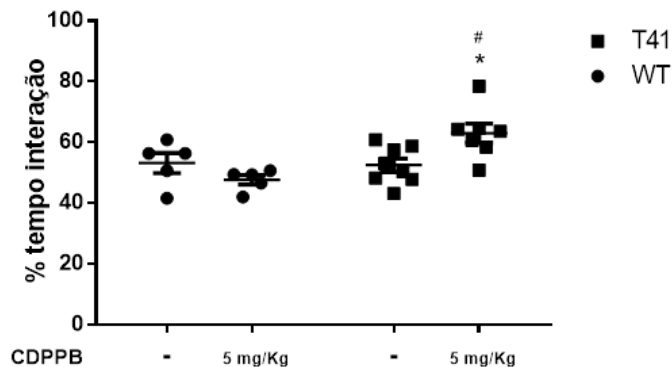


Figura 32. Interação social de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade. Gráfico de dispersão do resultado do percentual de tempo de interação com o animal juvenil em relação ao tempo na câmara do animal juvenil somado ao tempo na câmara vazia. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$, comparado com o grupo WT + veículo e # $p<0,05$ comparado com o grupo T41 + veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

Não houve diferença estatística entre a porcentagem de tempo de interação com o novo animal juvenil e o antigo entre os grupos [fator tratamento vs genótipo ($F(1,21)=1,206$; ns), fator genótipo ($F(1,21)=0,005$; ns) e fator tratamento ($F(1,21)=0,051$; ns) Figura 33].

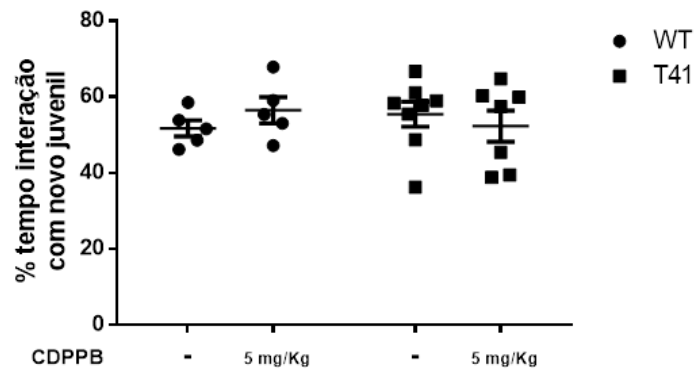


Figura 33. Memória social de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade. Gráfico de dispersão do resultado do percentual de tempo de interação com o novo animal juvenil. Os resultados são expressos como média \pm EPM (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.7 CDPPB não afeta a redução no comportamento de enterrar bolinhas de animais T41

Os animais foram submetidos ao teste de *Murble Burying* para avaliação do comportamento do tipo compulsivo e tipo ansioso. Animais do grupo T41 + veículo enterraram significativamente menos bolinhas quando comparados com o grupo WT + veículo; e animais do grupo T41 + CDPPB 5 enterraram significativamente menos bolinhas quando comparados com o grupo WT + CDPPB 5 [fator tratamento vs genótipo ($F(1,20)=0,023$; ns), fator genótipo ($F(1,20)=23,39$; $p=0,0001$) e fator tratamento ($F(1,20)=0,023$; ns); Figura 34].

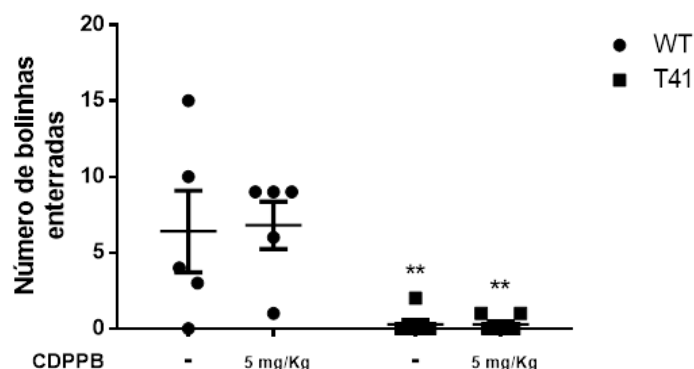


Figura 34. Número de bolinhas enterradas pelos animais transgênicos T41 com 14 meses de idade. Gráfico de dispersão do resultado do número de bolinhas enterradas. Os resultados são expressos como média \pm EPM. ** $p<0,01$, comparado com o grupo WT de mesmo tratamento (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.8 Não há alteração do comportamento tipo ansioso no LCE em animais T41 e nenhum efeito do CDPPB é observado

Os animais foram submetidos ao LCE para avaliação do comportamento semelhante ao ansioso. Neste teste, foi avaliado o tempo de permanência nos braços fechados e aberto e calculada a porcentagem de permanência no braço aberto. Não houve diferença no percentual de tempo gasto nos braços abertos entre os grupos [fator tratamento vs genótipo ($F(1,18)=0,958$; ns), fator genótipo ($F(1,18)=0,089$; ns) e fator tratamento ($F(1,18)=2,291$; ns)]. Também não houve diferença no número de entradas em braços [fator tratamento vs genótipo ($F(1,20)=0,038$; ns), fator genótipo ($F(1,20)=0,104$; ns) e fator tratamento ($F(1,20)=0,161$; ns)] e na distância total percorrida pelos animais [fator tratamento vs genótipo ($F(1,21)=0,724$; ns), fator genótipo ($F(1,21)=2,501$; ns) e fator tratamento ($F(1,21)=1,446$; ns); Figura 35].

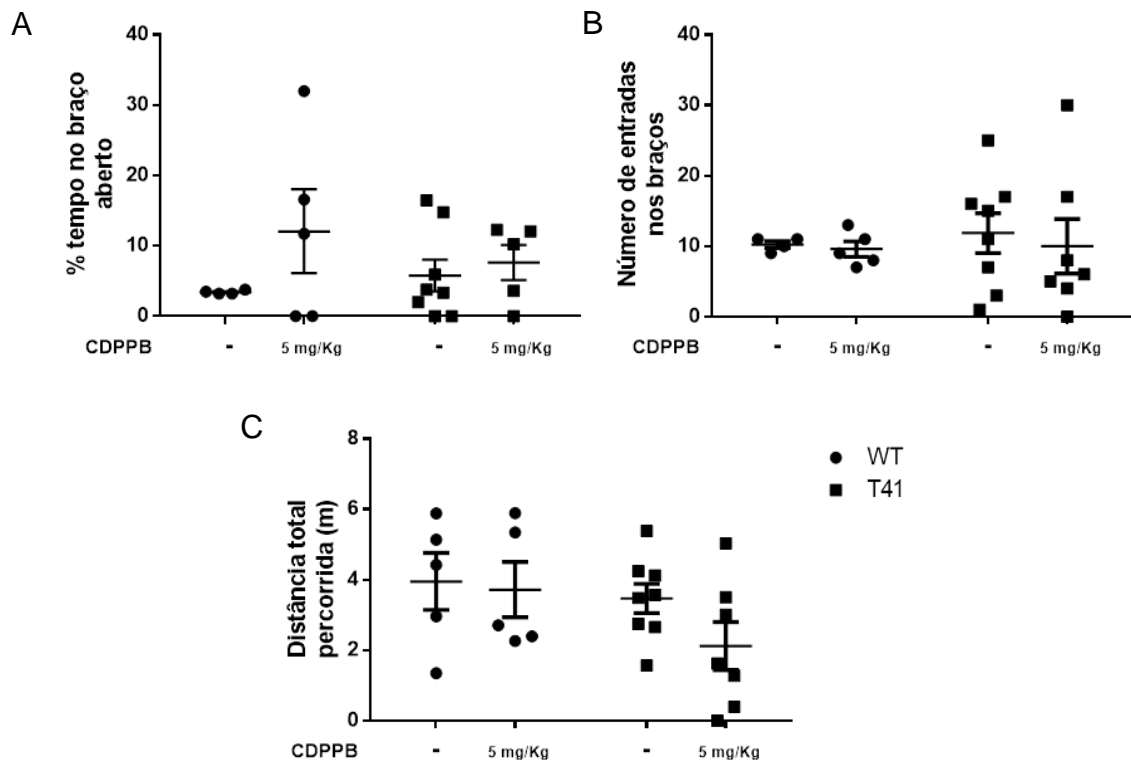


Figura 35. Labirinto em cruz elevado de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade. Gráficos de dispersão do resultado do percentual de tempo gasto nos braços abertos (A), do número total de entradas nos braços (B) e da distância total percorrida (C) no labirinto. Os resultados são expressos como média \pm EPM (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.9 CDPPB aumenta a viabilidade neuronal em animais T41 com 14 meses de idade

Avaliamos em seguida o número de neurônios viáveis na camada polimórfica do GD do hipocampo dos animais, uma das regiões mais afetadas pela neurodegeneração na DA. Observou-se que há perda significativa de neurônios no GD do hipocampo quando comparado com o controle. Nos animais WT, o CDPPB 5 não altera o número de células NeuN⁺ quando comparado com o controle, no entanto a contagem é significativamente maior do que no grupo T41 + veículo ($p < 0,05$). Já nos animais T41 tratados com CDPPB 5, há reversão da perda de quando comparados com os animais T41 não tratados [fator tratamento vs genótipo ($F(1,16)=0,370$; ns), fator genótipo ($F(1,16)=6,148$; $p=0,025$) e fator tratamento ($F(1,16)=7,183$; $p=0,016$); Figura 36].

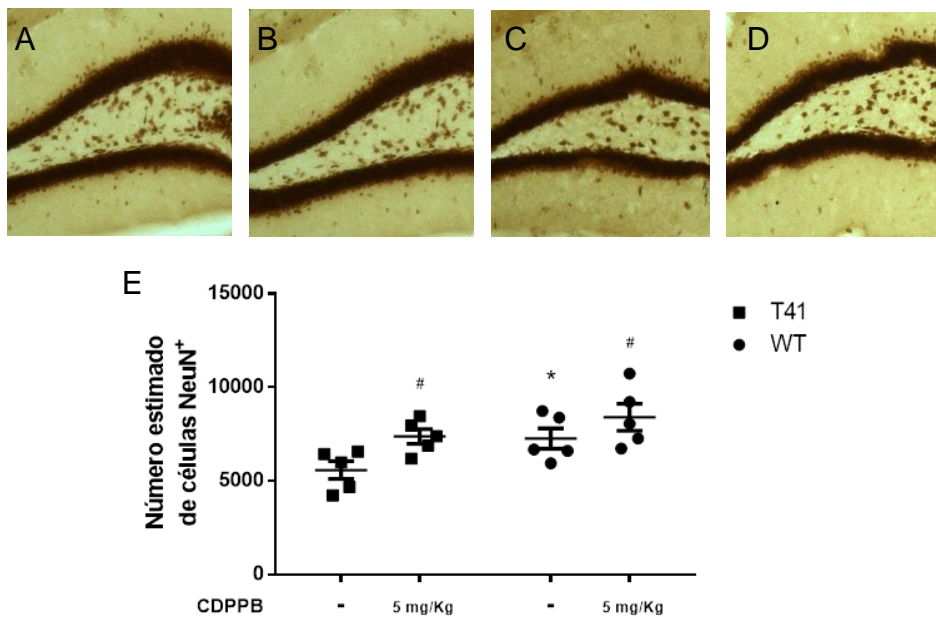


Figura 36. Efeito do CDPPB sobre a viabilidade neuronal em animais T41 tratados ou não com CDPPB. Imagens representativas da marcação de células NeuN⁺ no GD do hipocampo em fatias dos grupos WT + veículo (A), WT + CDPPB 5 (B), T41 + veículo (C), T41 + CDPPB 5 (D). Gráfico de dispersão do resultado da quantificação de NeuN nos grupos experimentais (E). * $p < 0,05$ comparado com o controle e # $p \leq 0,05$ comparado com animais T41 (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.10 CDPPB não diminui a quantidade de A β 1-40 no hipocampo e no córtex pré-frontal animais T41 com 14 meses de idade

Como o peptídeo A β está aumentado na DA e o CDPPB foi capaz de melhorar parâmetros associados com a doença, decidimos avaliar se o CDPPB é capaz de reduzir o conteúdo de peptídeo A β 1-40 no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais para avaliar se estava relacionado com seu efeito protetor. Os animais T41 apresentaram aumento da expressão de A β no hipocampo e o CDPPB não foi capaz de reverter o aumento do peptídeo [fator tratamento vs genótipo ($F(1,14)=0,960$; ns), fator genótipo ($F(1,14)=28,65$; $p=0,001$) e fator tratamento ($F(1,14)=0,390$; ns)]. O mesmo foi observado no córtex pré-frontal dos animais [fator tratamento vs genótipo ($F(1,14)=0,450$; ns), fator genótipo ($F(1,14)=38,96$; $p<0,001$) e fator tratamento ($F(1,14)=0,730$; ns); Figura 37)].

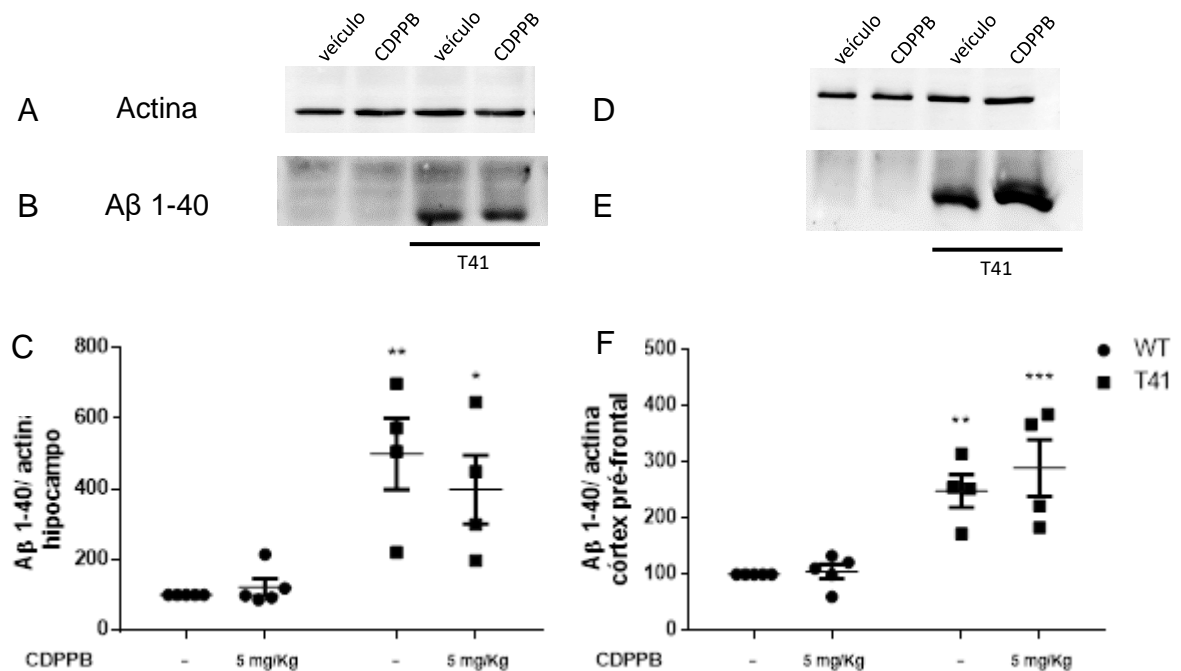


Figura 37. Efeito do CDPPB na expressão de A β 1-40 em animais T41. Imagens do western blotting de actina (A, D) e A β 1-40 (B, E) e gráficos de dispersão que ilustram a análise densitométrica de actina e A β 1-40 do hipocampo (C) e córtex (F) dos diferentes grupos de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, comparado com o grupo WT + veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.11 CDPPB reduz parcialmente a marcação de Iba-1 e GFAP em CA1, mas não altera a expressão CD68 no hipocampo dos animais T41 com 14 meses de idade

A neurodegeneração presente na doença está intimamente relacionada com um aumento da neuroinflamação e, conseqüentemente, com o aumento de células da glia. A microgliose foi avaliada por imunomarcação de Iba-1 e CD68, sendo que Iba-1 está presente em toda micróglia, e CD68 na micróglia com fagocitose ativa (WALKER; LUE, 2015); e a proliferação de astrócitos pela imunomarcação com GFAP.

Observamos que no GD do hipocampo, há aumento significativo da área de células Iba-1⁺ em animais T41, quando comparados com o controle, o que não é alterado pelo tratamento com CDPPB [fator tratamento vs genótipo ($F(1,16)=0,927$; ns), fator genótipo ($F(1,16)=39,41$; $p<0,001$) e fator tratamento ($F(1,16)=1,495$; ns)]. Na região CA1 também há aumento da marcação no modelo murino de DA. Apesar de não alterar a marcação de Iba-1 em animais WT, o CDPPB induz reversão parcial da marcação microglial em animais T41, uma vez que não difere estatisticamente dos animais controle [fator tratamento vs genótipo ($F(1,16)=1,054$; ns), fator genótipo ($F(1,16)=16,84$; $p<0,001$) e fator tratamento ($F(1,16)=0,959$; ns)].

A área marcada por CD68 aumenta significativamente no GD de animais T41 em relação ao controle, mas o que não é afetado pelo tratamento com CDPPB [fator tratamento vs genótipo ($F(1,15)=0,740$; ns), fator genótipo ($F(1,15)=70,130$; $p<0,001$) e fator tratamento ($F(1,15)=0,030$; ns)]. Foi detectado o mesmo perfil de marcação de CD68 na região CA1 do hipocampo [fator tratamento vs genótipo ($F(1,15)=0,081$; ns), fator genótipo ($F(1,15)=15,150$; $p=0,0014$) e fator tratamento ($F(1,15)=0,203$; ns)].

A área marcada por GFAP também está aumentada no GD de animais T41 em comparação com o grupo WT. O CDPPB não alterou GFAP em animais controle ou T41, em referência aos animais de mesmo genótipo sem administração da droga [fator tratamento vs genótipo ($F(1,16)=0,927$; ns), fator genótipo ($F(1,16)=39,410$; $p<0,001$) e fator tratamento ($F(1,16)=1,495$; ns)]. Em CA1 houve aumento da área de GFAP em animais T41 em relação ao controle. O tratamento não induziu nenhuma alteração *per se*, mas reverteu parcialmente a marcação de astrócitos em animais transgênicos, já que este grupo não diferiu do controle [fator tratamento vs genótipo ($F(1,16)=1,576$; ns), fator genótipo ($F(1,16)=18,900$; $p<0,001$) e fator tratamento ($F(1,16)=1,634$; ns); Figura 38].

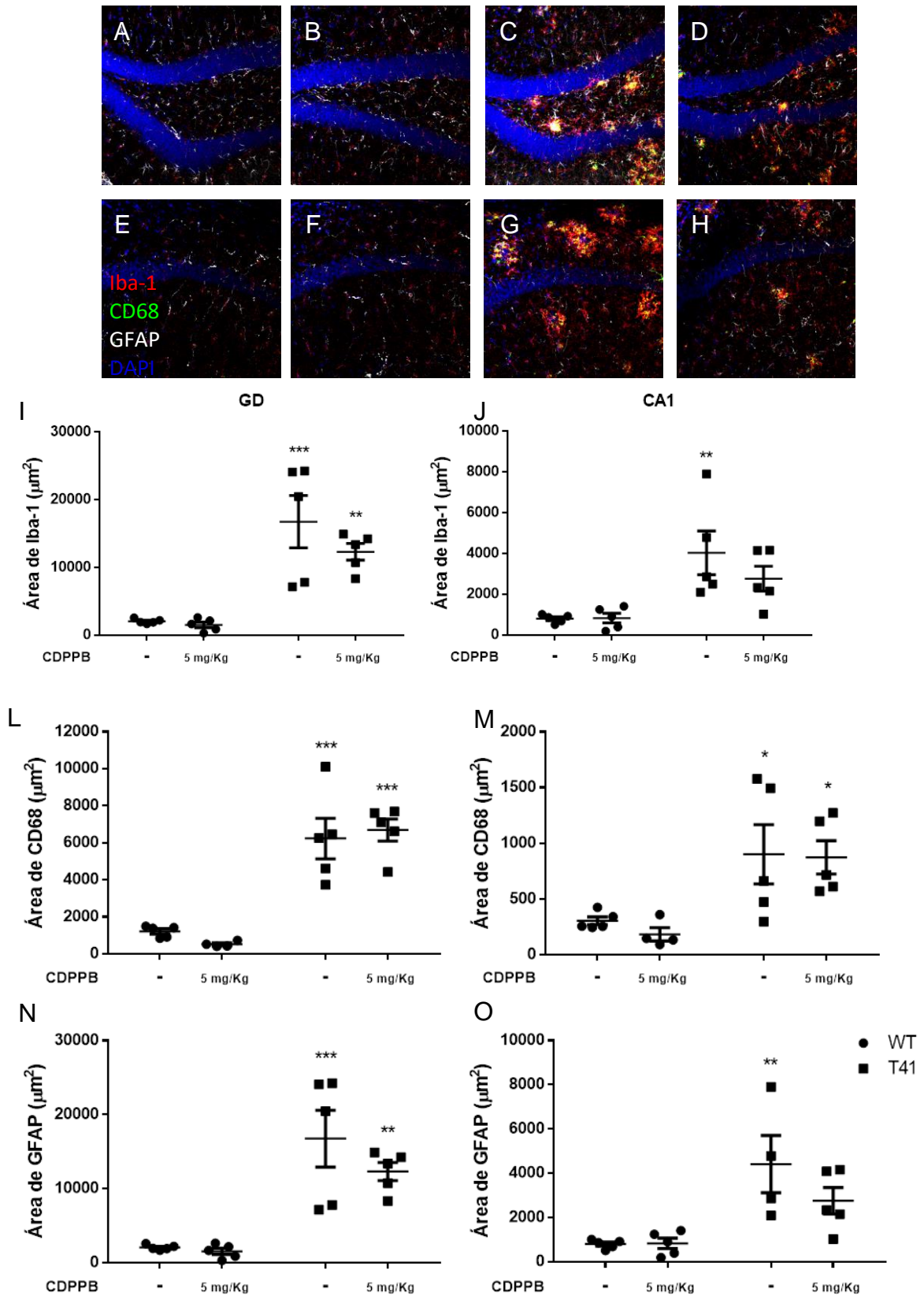


Figura 38. Efeito do CDPPB sobre a expressão de Iba-1, CD68 e GFAP em animais T41 tratados ou não com CDPPB. Imagens representativas da imunomarcagem no GD e em CA1 dos grupos WT + veículo (A, E), WT + CDPPB 5 (B, F), T41 + veículo (C, G) e T41 + CDPPB 5 (G, H). Gráficos de dispersão do resultado da quantificação em GD e CA1 de Iba-1 (I, J), CD68 (L, M) e GFAP (N, O) nos grupos experimentais. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001, comparado com o controle (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.12 Não há alteração de citocinas anti e pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal de animais T41 com 14 meses de idade

As citocinas liberadas pela glia também são importantes marcadores inflamatórios. Entretanto não houve alteração na concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17A e IL-10 no hipocampo (Tabela 6) e no córtex pré-frontal (Tabela 7) de animais transgênicos T41 tratados ou não com CDPPB 5 no pós-teste de Newmann-Keuls.

Hipocampo	Análise estatística da concentração de citocina (pg/mg de proteína)		
Citocina	Fator tratamento vs genótipo F (1,18)	Fator genótipo F (1,18)	Fator tratamento F (1,18)
IL-2	0,049, ns	0,012, ns	0,790, ns
IL-4	0,007, ns	0,001, ns	0,582, ns
IL-6	0,075, ns	1,204, ns	0,169, ns
IFN- γ	1,119, ns	0,007, ns	0,138, ns
TNF- α	0,049, ns	0,277, ns	0,957, ns
IL-17A	0,041, ns	2,323, ns	0,506, ns
IL-10	1,590, ns	0,086, ns	0,013, ns

Tabela 6. Análise estatística da concentração de citocinas no hipocampo dos animais transgênicos tratados com CDPPB e seus controles (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

Córtex	Análise estatística da concentração de citocina (pg/mg de proteína)		
Citocina	Fator tratamento vs genótipo F (1,18)	Fator genótipo F (1,18)	Fator tratamento F (1,18)
IL-2	0,300, ns	0,016, ns	0,939, ns
IL-4	0,039, ns	0,480, ns	4,743, p=0,043
IL-6	0,448, ns	0,112, ns	1,793, ns
IFN- γ	1,352, ns	0,709, ns	2,702, ns
TNF- α	0,052, ns	0,785, ns	0,283, ns
IL-17A	0,011, ns	0,103, ns	0,925, ns
IL-10	0,068, ns	0,030, ns	2,212, p=0,010

Tabela 7. Análise estatística da concentração de citocinas no córtex pré-frontal dos animais transgênicos tratados com CDPPB e seus controles (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3.15 Efeito do CDPPB sobre lipídeos séricos e função hepática

Uma vez que desordens lipídicas são frequentemente associadas com DA, decidimos avaliar a concentração sérica de colesterol total e triglicérides nos animais T41, tratados ou não com CDPPB. Observamos influência do fator tratamento na dosagem de colesterol [fator tratamento vs genótipo ($F(1,25)=0,107$; ns), fator genótipo ($F(1,25)=0,001$; ns) e fator tratamento ($F(1,25)=6,812$; $p=0,015$)], mas não houve diferença entre os grupos no pós-teste. Não houve diferença entre os grupos nos níveis de triglicérides [fator tratamento vs genótipo ($F(1,26)=0,327$; ns), fator genótipo ($F(1,26)=0,027$; ns) e fator tratamento ($F(1,26)=0,922$; ns); Figura 39].

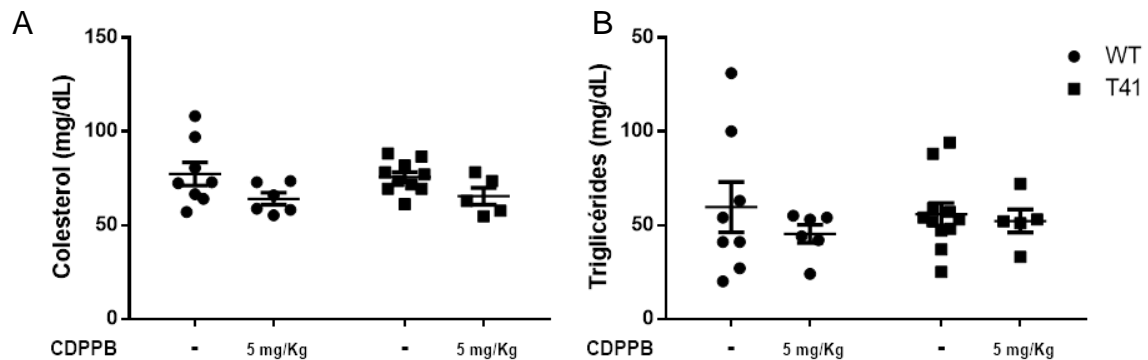


Figura 39. Dosagem de colesterol total (A) e triglicérides (B) de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade. Gráficos de dispersão do resultado da concentração sérica em mg/dL. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

Muitas drogas apresentam toxicidade hepática devido ao metabolismo realizado pelo fígado. Dessa forma, também decidimos avaliar se o CDPPB afeta a função hepática através da dosagem sérica das enzimas hepáticas FA e ALT. Apenas a ALT apresentou diminuição nos animais T41 tratados com CDPPB 5, quando comparados com o controle. Não observamos alteração sérica de FA ou de nenhum outro grupo para ALT [FA: fator tratamento vs genótipo ($F(1,26)=1,368$; ns), fator genótipo ($F(1,26)=3,286$; ns) e fator tratamento ($F(1,26)=0,004$; ns); ALT: fator tratamento vs genótipo ($F(1,20)=0,321$; ns), fator genótipo ($F(1,20)=3,137$; ns) e fator tratamento ($F(1,20)=6,303$; $p=0,021$); Figura 40].

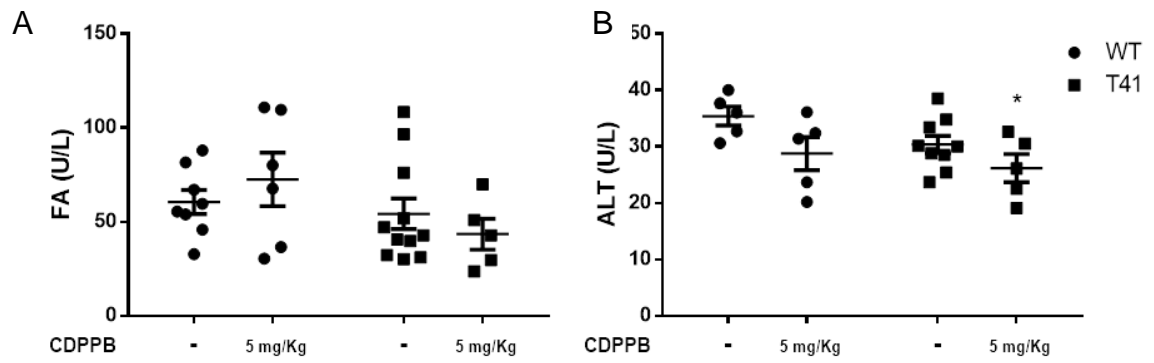


Figura 40. Dosagem de FA (A) e ALT (B) de animais transgênicos T41 com 14 meses de idade. Gráficos de dispersão do resultado da concentração sérica em U/L. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com o controle (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

Apesar da DA ter sido descrita pela primeira vez há mais de um século e dos grandes avanços na compreensão da sua fisiopatologia, nenhum tratamento eficaz foi desenvolvido até o momento (GREENFIELD, 2013). Dessa forma, mesmo com os tratamentos sintomáticos disponíveis, ainda carecemos de drogas que atuem modificando o curso da doença (ARAI et al., 2016).

No presente estudo nós demonstramos que o CDPBP previne a morte neuronal induzida por A β *in vitro*, bem como previne os déficits de memória induzidos pelo peptídeo A β 1-42 em dois testes diferentes, impede a redução significativa de neurônios e a neurodegeneração induzidas pelo peptídeo, além de aumentar os níveis da neurotrofina BDNF. Além disso, em modelo transgênico, apesar de o tratamento por 4 semanas não ter revertido os déficits cognitivos, houve uma prevenção da perda neuronal e uma reversão parcial do aumento de micróglia e de astrócitos.

Estudos anteriores demonstraram que a injeção intracerebral de A β induz déficit de memória em diferentes estudos e tarefas comportamentais, como labirinto aquático de Morris (AHMAD et al., 2016; HU, Z. et al., 2016; KALRA et al., 2016; LI, J. et al., 2016; SHARIATPANAHI et al., 2016), TRO (BELLOZI et al., 2016; FURUKAWA-HIBI et al., 2011; KALRA et al., 2016; LEGGIO et al., 2016), Labirinto em Y e Esquiva Passiva (LEGGIO et al., 2016; MEUNIER; IENI; MAURICE, 2006; MOON et al., 2011), o que foi confirmado em nosso estudo, tanto na TRO, quanto no medo condicionado ao contexto. Entretanto, no labirinto em Y, a A β não induziu déficit cognitivo, o que pode estar relacionado com o fato de ter sido injetada no hipocampo dos animais, uma vez que essa tarefa comportamental avalia a memória de trabalho, a qual está associada à integridade da atividade cortical. Uma vez que a A β induz morte neuronal em seu entorno, a sua injeção no hipocampo induz neurodegeneração hipocampal comprometendo a função dessa região de formação de memória (LEE, H. G. et al., 2007).

No que diz respeito aos testes de memória, o mGluR5 é importante para o aprendizado e consolidação da memória, e já está descrito que o tratamento com CDPBP reverte os déficits cognitivos induzidos pelo antagonismo do receptor NMDA (FOWLER et al., 2011; HORIO et al., 2013; STEFANI; MOGHADDAM, 2010) e pela administração crônica de metanfetamina (REICHEL et al., 2011). Moduladores alostéricos positivos de mGluR5 melhoram tanto a LTP, que está diminuída na DA

(LAMBERT et al., 1998; WALSH et al., 2002), quanto a LTD. Sabe-se também que CDPPB e ADX47273, dois MAPs do mesmo receptor, potencializam o aprendizado e melhoram a memória dependentes de hipocampo, fenômenos dependentes de LTP (AYALA et al., 2009).

No presente estudo, demonstramos que, após a injeção de A β , o CDPPB é também capaz de melhorar os déficits cognitivos e restabelecer as memórias contextual e aversiva aos níveis dos animais controles, mostrando potencial da droga para melhorar a memória em desordens do SNC, o que pode estar relacionado com a estimulação de LTP.

Além da avaliação comportamental em animais injetados com A β , os animais transgênicos também foram avaliados em tarefas de memória. Com 14 meses de idade, foi possível observar a redução da cognição na tarefa de reconhecimento de objetos. Esses dados estão de acordo com a literatura, já tendo sido demonstrados déficits de memória de animais transgênicos para APP em diferentes tarefas comportamentais (EVANS et al., 2018; GOTZ; ITTNER, 2008; KALLOP et al., 2014; KELLY et al., 2017; KNOWLES et al., 2013; ODDO et al., 2006). Porém, nos animais transgênicos, o CDPPB não foi capaz de reverter o déficit cognitivo na TRO. Entretanto, houve diminuição da distância total percorrida pelos animais T41 tratados com a droga nessa tarefa, o que, conseqüentemente, pode ter comprometido a exploração nesse grupo. Além disso, pode ser necessário um tratamento prolongado para que a droga possa exercer efeito na cognição em um modelo que mimetiza melhor a DA, pois o peptídeo A β não está atuando apenas em região específica do hipocampo, mas tem sua síntese aumentada em todo o cérebro. Não observamos déficits de memória no medo condicionado ao contexto, no labirinto em Y e no teste de memória social. Contudo, a detecção de comprometimento cognitivo não é dependente apenas da mutação genética, mas pode ser influenciada pelo *background* da linhagem dos animais avaliados, por variações no protocolo, incluindo pré-testes e repetições, e pelo gênero (FAIZI et al., 2012). Dessa forma, estudos com diferentes linhagens transgênicas para determinada doença, ou até mesmo com linhagens similares, podem apresentar diferenças quanto à performance dos animais nas tarefas (ELDER; GAMA SOSA; DE GASPERI, 2010).

Além dos déficits de memória, outras alterações comportamentais ocorrem com a progressão da DA nos pacientes, bem como em modelos animais da doença, ocorrendo, por exemplo, a diminuição da interação social (HUANG, H. et al., 2016; LI,

C. et al., 2015). O convívio social pode reduzir o declínio cognitivo, inclusive em camundongos transgênicos para DA, aumentando os níveis de BDNF e a neurogênese no GD hipocampal (APOSTOLOVA et al., 2014; DUFF et al., 2013; HSIAO et al., 2014). Apesar de não ter ocorrido a diminuição da interação social nos animais T41, o CDPPB foi capaz de aumentá-la nos animais transgênicos, o que possui potencial para auxiliar em uma melhora cognitiva num tratamento prolongado, aumento de BDNF e neurogênese.

Assim como demonstrado no presente estudo, há redução do número de bolinhas enterradas no teste de *marble burying* em outra linhagem transgênica para DA (KIM et al., 2012). Entretanto, animais triplo-transgênicos para DA apresentam aumento no comportamento de enterrar bolinhas (TORRES-LISTA; LOPEZ-POUSA; GIMENEZ-LLORT, 2015). Considerando que o comportamento de enterrar bolinhas também pode refletir um comportamento tipo ansioso (DE BROUWER; WOLMARANS, 2018), podem-se caracterizar comportamentos ansiolíticos no teste de *marble burying*, através da diminuição de bolinhas enterradas (KEDIA; CHATTARJI, 2014). Dessa forma, para avaliar esse comportamento também submetemos os animais ao LCE.

Sinais de ansiedade acompanhados de atrofia do córtex entorrinal podem acelerar o declínio cognitivo que precede a DA (MAH et al., 2015), bem como sinais de ansiedade já foram relatados em pacientes com a DA (APOSTOLOVA et al., 2014). Também está descrito que modelos animais de DA podem apresentar tanto estado hipoansioso quanto hiperansioso, os quais podem ser avaliados pelo LCE (LALONDE; FUKUCHI; STRAZIELLE, 2012). O comportamento tipo ansioso pode ser modificado com a progressão da DA, podendo diminuir (JAWHAR et al., 2012; WITTNAM et al., 2012) ou aumentar (STEFANOVA et al., 2014). Aqui, demonstramos que os animais da linhagem T41 não apresentam alterações no comportamento tipo ansioso. Está descrito que o CDPPB não altera a performance de animais no LCE (MENARD et al., 2013), o que também foi observado nesse estudo. Dessa forma, o comportamento observado no teste de *marble burying* provavelmente não está relacionado a uma redução do comportamento tipo-ansioso nos animais T41. Entretanto, a performance dos animais transgênicos, tratados ou não, no teste de *marble burying* pode estar relacionada com o comprometimento da atividade hipocampal, já que lesões no hipocampo são capazes de comprometer o comportamento de enterrar bolinhas (DEACON; RAWLINS, 2005). Porém, o CDPPB não altera esse comportamento na

idade e pelo tempo de tratamento avaliados, demonstrando que a droga ou não é capaz de reverter esse comportamento nos animais, ou o momento do início do tratamento e duração foram insuficientes para provocar potenciais alterações. É importante ainda dizer que o sucesso de modelos de camundongos transgênicos para a DA depende da superexpressão de transgenes de APP contendo mutações associadas à doença na forma familiar em níveis que não são fisiológicos, o que pode dificultar a avaliação dos efeitos de determinadas drogas (ELDER et al., 2010).

Apesar de na idade de 14 meses já haver uma expressão aumentada de A β em animais T41, conforme observamos no *western blotting*, o CDPPB não foi de alterar a quantidade do peptídeo. Dessa forma, com a patologia instalada, a droga pode não ser capaz de reverter todas as alterações cognitivas ou pode ser necessário um tratamento por período mais longo do que 28 dias para que ocorram esses efeitos.

As alterações comportamentais presentes na DA são acompanhadas por alterações bioquímicas e histológicas. A neurodegeneração é a principal característica, e já foi previamente demonstrado que a A β induz morte neuronal tanto *in vitro* (BELLOZI et al., 2016; HUANG, X. et al., 2012; SANPHUI; BISWAS, 2013; YE; ZHANG, 2012) quanto *in vivo* (BELLOZI et al., 2016; BERNAL-MONDRAGON et al., 2013; CANAS et al., 2009; CORBETT et al., 2013; LI, J. et al., 2016; WANG, L. et al., 2012; WANG, M. et al., 2017). Em modelos murinos de DA também já é bem estabelecida a neurodegeneração (ALI et al., 2017; LI, F. et al., 2015; PENSALFINI et al., 2014; ZHU et al., 2015).

Em relação ao potencial efeito neuroprotetor da droga, foi previamente demonstrado em modelo de traumatismo craniano que a droga VU0360172, um MAP de mGluR5, promove neuroproteção e melhora da função motora (LOANE et al., 2014). Um potente MAS do mGluR5 reduz a perda sináptica em modelo de DA por reduzir a interação do receptor com a A β ligada à proteína priônica celular (HAAS et al., 2017). O agonismo de mGluR5 por CHPG reduz a morte celular induzida por A β em culturas primárias de neurônios (MOVSESYAN; STOICA; FADEN, 2004). Por fim, o CDPPB reduz a morte neuronal induzida por glutamato em culturas de neurônios e em modelo transgênico de Doença de Huntington (BATISTA et al., 2016; DORIA et al., 2015). No presente estudo, demonstramos a morte neuronal induzida pela A β , tanto em culturas de neurônios hipocâmpais quanto no hipocampo de camundongos, bem como a diminuição da viabilidade neuronal nessa região. A morte neuronal foi prevenida por CDPPB em culturas e no hipocampo. Apesar de a injeção de A β não

ter reduzido significativamente o número de neurônios viáveis nessa região em relação ao controle, o número de neurônios viáveis do grupo tratado com a maior dose de CDPPB também não foi diferente do controle. Ainda, em animais transgênicos T41 há redução significativa da viabilidade neuronal, e o tratamento por 28 dias com CDPPB reverte essa perda de neurônios. Isto corrobora o potencial neuroprotetor da droga. Além disso, é descrito que o mGluR5 medeia a neurogênese, sendo que agonistas do receptor podem aumentar a proliferação celular; bem como antagonistas ou a supressão da expressão do receptor reduzem a neurogênese (ERICHSEN et al., 2015; ZHAO et al., 2014).

Com o objetivo de verificar os mecanismos da neuroproteção induzida por CDPPB, medimos os níveis de BDNF no hipocampo. Essa neurotrofina está envolvida na proliferação, diferenciação e sobrevivência neuronal e glial, além de mediar funções cognitivas, como aprendizagem e formação de memória (QUERFURTH; LAFERLA, 2010). Pacientes com DA possuem redução significativa de BDNF hipocampal, o que pode estar associado com o acúmulo de A β (CASTELLO; GREEN; LAFERLA, 2012). Entretanto, essa diminuição parece ser dependente da idade e da evolução da patologia, inclusive do acúmulo do peptídeo A β (NAERT; RIVEST, 2012). Além do descrito acima, o tratamento de modelos animais para DA com BDNF é capaz de melhorar a função sináptica, a formação de memória e a sobrevivência neuronal (QUERFURTH; LAFERLA, 2010). Apesar de alguns estudos demonstrarem diminuição de BDNF com o acúmulo de A β em modelos murinos de DA (LI, J. et al., 2016), isso não foi detectado no presente estudo. Nossa observação pode estar relacionada com o modelo e o protocolo de escolha, em que realizamos as avaliações histológicas e bioquímicas no 7º dia após a injeção intra-hipocampal do peptídeo. Contudo, foi possível observar o aumento significativo de BDNF no hipocampo ipsilateral e contralateral dos animais que foram injetados com o peptídeo e tratados com a maior dose do CDPPB, estando a neurotrofina potencialmente associada à neuroproteção conferida pela droga.

O acúmulo de A β e a neurodegeneração presentes na DA podem desencadear a neuroinflamação, que começa como um mecanismo de defesa contra os danos causados pelo peptídeo e pelos emaranhados neurofibrilares, mas que pode contribuir, posteriormente, para o processo neurodegenerativo (GIOVANNINI et al., 2002). A neuroinflamação é mediada principalmente pelas células da glia, especialmente pela micróglia e pelos astrócitos (ASO et al., 2015; HURLEY; TIZABI,

2013; JANOTA et al., 2015; RUAN et al., 2018), que se acumulam no entorno das placas senis (HICKMAN et al., 2008; KETTENMANN et al., 2011), promovendo, inicialmente, a fagocitose da A β (HICKMAN et al., 2008; ZENG et al., 2018). Entretanto, a gliose também contribui para a neurodegeneração, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, neurotoxinas e outras substâncias (GIOVANNINI et al., 2002; MARSH et al., 2016; PLOJ et al., 2010), como EROs, contribuindo para a morte neuronal (MOKHTAR et al., 2013). Com a progressão da DA a glia tem sua capacidade de fagocitar a A β diminuída, mas não perde a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , as quais, por sua vez, estimulam a formação do peptídeo, contribuindo para o agravamento da patologia (HICKMAN et al., 2008). Portanto, a redução da gliose e, conseqüentemente, da neuroinflamação, pode representar importante mecanismo de terapias para tratamento da DA.

Somando-se aos dados anteriormente descritos, já foi demonstrado que a micróglia expressa receptores mGluR5, e que a sua ativação pelo agonista CHPG inibe a ativação microglial e liberação de citocinas pró-inflamatórias, em parte devido à inibição de NADPH oxidase (BYRNES; STOICA; RICCIO; et al., 2009). Após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS), a ativação de mGluR5 com CHPG também é capaz de reduzir a ativação microglial, produção de óxido nítrico, EROs e TNF- α (BYRNES; STOICA; LOANE; et al., 2009; LOANE et al., 2009). Ademais, astrócitos também expressam esse receptor, o que é importante para a modulação da eficácia da transmissão sináptica e do fluxo sanguíneo local mediados por essas células da glia (ARIZONO; BANNAI; MIKOSHIBA, 2014). Um trabalho publicado recentemente também demonstrou a prevenção da gliose por ativação de mGluR5 em um modelo de lesão cerebral traumática (XUE et al., 2014).

Entretanto, apesar de já termos observado previamente a microgliose induzida por A β no mesmo modelo (BELLOZI et al., 2016), no presente trabalho não observamos alteração microglial significativa no hipocampo ipsilateral, bem como os astrócitos também não foram alterados pela injeção de A β . Já nos animais transgênicos T41, observamos aumento da microgliose e da astrocitose. O CDPPB foi capaz de reverter parcialmente o aumento da micróglia e dos astrócitos na região CA1 do hipocampo de animais T41. Como as células da glia estão ativadas desde fases iniciais da DA (GIOVANNINI et al., 2002; HICKMAN et al., 2008; PHILLIPS et al., 2014), sua redução mais pronunciada pode exigir um tratamento crônico. Visto

que o tratamento com CDPPB nos 2 modelos (injeção de A β e animais transgênicos T41) foi capaz de causar alteração na viabilidade neuronal, a diminuição da neurodegeneração poderia influenciar na redução da neuroinflamação. Contudo, para tanto, seria necessária a avaliação de tratamentos prolongados e iniciados em diferentes fases da doença, utilizando preferencialmente os modelos transgênicos.

Uma vez que encontramos gliose em animais T41, apesar dessa condição não ter sido observada após a injeção de A β , avaliamos se citocinas pró-inflamatórias, as quais contribuem para o processo neuroinflamatório presente na DA (HURLEY; TIZABI, 2013), estavam alteradas nos grupos avaliados. Além disso, avaliamos se ocorreu alteração de citocinas anti-inflamatórias, que controlam a resposta inflamatória da glia e de macrófagos, contribuindo para a degradação da A β e diminuição da morte neuronal (CHAKRABARTY et al., 2012).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias com alterações no presente estudo, a IL-2 possui atividade citotóxica e induz a secreção de IFN- γ (LYONS et al., 2011). Apesar de já ter sido encontrada inalterada em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com DA (SPECIALE et al., 2007), já foi relatado seu aumento no hipocampal (PETITTO; MEOLA; HUANG, 2012). Ela também pode estar aumentada no sangue de animais transgênicos para DA (CAO et al., 2009). A IL-2 foi encontrada diminuída apenas no hipocampo contralateral dos animais submetidos à cirurgia para injeção de A β e cujo tratamento com CDPPB na maior dose foi iniciado no mesmo dia da cirurgia. Isso poderia contribuir para um potencial efeito cognitivo do CDPPB, uma vez que elevados níveis da citocina contribuem para diminuição da liberação de ACh e disfunções cognitivas, enquanto baixas quantidades influenciam potencializam a liberação desse neurotransmissor (PETITTO et al., 2012).

A IL-6 estimula a produção de proteínas de fase aguda e promove gliose, estando alterada em doenças neuroinflamatórias como a DA (ERTA; QUINTANA; HIDALGO, 2012; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ, 2012), já tendo sido demonstrado o seu aumento em alguns modelos murinos da doença (JIN, Y. et al., 2005; ZHANG, Y. Y. et al., 2013). Entretanto, apenas o seu mRNA pode estar elevado, mas a citocina não ser encontrada alterada em modelo de DA (WILCOCK et al., 2011). Somando-se a isso, a IL-6 regula negativamente a LTP e a consolidação da memória, podendo comprometer a cognição (BALSCHUN et al., 2004). No presente estudo não encontramos alterações de IL-6 induzidas por A β ou aumento nos animais T41. Já foi demonstrado que um agonista e um MAP de mGluR5 são

capazes de reduzir essa citocina em modelo de injúria cerebral (ZHANG et al., 2015). Aqui, verificamos que o CDPPB na maior dose, causou diminuição de IL-6 no hipocampo contralateral dos animais submetidos à cirurgia de injeção intra-hipocampal de A β , cujo tratamento foi iniciado no mesmo dia do procedimento. Como já foi demonstrado que a IL-6 possui expressão aumentada no entorno das placas amiloides e no fluido cerebrospinal na DA, que em culturas de células gliais, estimula a síntese da APP, e em culturas de neurônios corticais aumenta o dano induzido por A β (ERTA et al., 2012), a sua redução por CDPPB pode diminuir a neurotoxicidade do peptídeo, contribuindo para a neuroproteção e, conseqüentemente, melhora dos sintomas cognitivos.

A citocina IL-17A também é importante em processos inflamatórios, contribuindo para gliose (ZIMMERMANN et al., 2013), e já foi relatada em níveis elevados em modelos de DA (JIN, J. J. et al., 2008; ZHANG, J. et al., 2013). No presente estudo não encontramos alterações de IL-6 induzidas por A β ou aumento nos animais T41. Demonstramos, entretanto, que o CDPPB, na maior dose, causou diminuição de IL-17A no hipocampo contralateral dos animais submetidos à cirurgia de injeção intra-hipocampal de A β , cujo tratamento foi iniciado no mesmo dia do procedimento. Esse efeito tem um potencial neuroprotetor, uma vez que já foi demonstrado que essa citocina intensifica a excitotoxicidade glutamatérgica (KOSTIC et al., 2014; KOSTIC et al., 2017).

A IL-10 possui potencial para melhorar a neuroinflamação presente na DA (KIYOTA et al., 2010) uma vez que interage com receptores de superfície, especialmente de células da glia (RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ, 2012), o que lhe confere capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ e TNF- α (KIYOTA et al., 2010; MESQUITA et al., 2008). Neste estudo, encontramos redução de IL-10 no hipocampo ipsilateral de animais submetidos à cirurgia para injeção de A β e tratados com veículo ou com CDPPB na maior dose, com tratamento iniciado no mesmo dia do procedimento, bem como com tratamento iniciado uma semana após a cirurgia. A redução de IL-10 pode contribuir para desregulação do controle da neuroinflamação, para disfunção cognitiva e para a neurodegeneração nesses animais (KIYOTA et al., 2010). Porém, nos animais T41 não houve alterações nos níveis dessa citocina no hipocampo ou no córtex pré-frontal.

De forma geral, ocorreram alterações pontuais de citocinas nos modelos avaliados. No modelo de injeção de A β , isso pode estar associado com um tempo que

mimetiza uma fase mais inicial da DA. Já no modelo transgênico, a neuroinflamação é um processo crônico e que está presente nos animais, conforme demonstrado através da microgliose e da astrocitose. Entretanto na fase estudada não houve alteração significativa dos níveis dos mediadores inflamatórios avaliados. Isso pode ocorrer porque a inflamação observada no cérebro do paciente com DA não é adequadamente reproduzida em todos os modelos murinos transgênicos, pois há diferenças entre as espécies, no que diz respeito à natureza e gravidade da inflamação (LITHNER; HEDBERG; NORDBERG, 2011; SCHWAB; HOSOKAWA; MCGEER, 2004; WEBSTER et al., 1999). Mesmo sem grandes variações de citocinas estarem presentes nos modelos aqui estudados, o CDPPB promoveu algumas alterações que podem representar mecanismos associados à sua neuroproteção e que poderiam, em tratamentos mais prologados, estar mais evidentes.

Da mesma forma que há comorbidades comportamentais associadas à DA, há também outras doenças sistêmicas, como as dislipidemias, que podem inclusive contribuir para a progressão da doença (OLIVEIRA et al., 2018). O colesterol e seus derivados induzem apoptose neuronal, estresse oxidativo e hiperfosforilação da tau (MA, M. T. et al., 2010; MCLAURIN; DARABIE; MORRISON, 2003). Dessa forma, decidimos avaliar se nos animais transgênicos dessa linhagem havia indícios de dislipidemia associada à DA, e qual seria o efeito do CDPPB nesse caso. Contudo, observamos que os animais T41 não apresentam indícios de dislipidemia. De forma importante, o CDPPB, além de não alterar a massa corporal, também não altera os lipídeos avaliados. De acordo, não encontramos dados na literatura que demonstrem efeitos da modulação de mGluR5 no metabolismo de lipídeos, apesar de agonistas do receptor poderem estimular o aumento do consumo de comida (BRADBURY et al., 2005; PLOJ et al., 2010).

É ainda importante ressaltar que muitas drogas com efeitos benéficos para o tratamento de determinada doença são capazes, no entanto, de induzir efeitos sistêmicos tóxicos. Grande parte das drogas sofre metabolismo hepático, e a hepatotoxicidade é uma das principais causas de recolhimento de fármacos recém-chegados ao mercado (NJOKU, 2014). Para que uma droga tenha segurança para uso, um dos fatores que é avaliado é a toxicidade hepática. Dois dos marcadores hepáticos de extrema importância para avaliação de problemas hepáticos são as enzimas ALT e FA (REGEV, 2014). Dessa forma, fizemos a coleta sanguínea no último dia de tratamento dos animais no momento do sacrifício, e dosagem dessas

duas enzimas para avaliação de indícios de toxicidade hepática induzidos pelo CDPPB, e não houve nenhum aumento dessas enzimas tanto no grupo WT quanto no grupo T41 tratados com a droga. Além disso, houve redução de ALT induzida por CDPPB nos animais T41, o que representa uma medida de segurança no uso da droga.

Conseguimos perceber, ao utilizar dois modelos diferentes para o Alzheimer, que a injeção de A β mimetiza alterações que ocorrem na DA. Utilizamos o modelo para observações de aspectos iniciais da doença. Já foi demonstrado que a injeção intracerebral de A β induz alterações progressivas associadas à DA, e que pode ser utilizado, portanto, para avaliação de alterações associadas ao Alzheimer em fases precoces e intermediárias (NAKAMURA et al., 2001).

Já o modelo transgênico mimetiza melhor o curso da doença, sendo importante para avaliações crônicas. Entretanto, a maioria dos modelos transgênicos são baseados na expressão de genes mutantes que causam a DA em um subgrupo relativamente pequeno de pacientes e que, apesar de mimetizar características clínicas e patológicas de casos esporádicos, podem induzir efeitos que não são encontrados na doença esporádica (ELDER et al., 2010), com expressão não fisiológica 5 a 10 vezes maior do que em pacientes, além de outras limitações como apresentarem déficits cognitivos precedendo os depósitos de A β (BALDUCCI; FORLONI, 2011). É ainda importante ressaltar que cada modelo animal não é capaz de apresentar todos os aspectos da patologia da DA, sendo que, para a investigação de intervenções terapêuticas, é necessário aproveitar o potencial de cada modelo (LI, C.; EBRAHIMI; SCHLUESNER, 2013).

Como a doença é progressiva, intervenções farmacológicas podem ser realizadas em diferentes fases da doença: antes do início das alterações fisiopatológicas; em uma fase intermediária; ou ainda em uma fase avançada. A escolha do melhor momento para a intervenção depende de estudos aprofundados sobre as características do modelo e do potencial farmacológico proposto para cada droga, e os modelos animais para DA são de extrema importância para elucidação dos mecanismos patogênicos da doença e já trouxeram novas hipóteses que permitem o desenvolvimento de terapias (BALES, 2012).

A hipótese de que a cascata de A β é a principal suspeita de iniciar a patogênese da DA direcionou a uma série de estudos em processos fisiológicos e patológicos que participam da produção, agregação e depuração de A β (JIA; DENG; QING, 2014). A

maioria dos fármacos para DA foi desenvolvida com base em pesquisas que implicam as fibrilas de A β na neuropatologia da doença, mas resultam apenas em melhorias modestas e de curto prazo na função cognitiva. Portanto, alvos adicionais precisam ser investigados (FERNANDEZ; BRITTON; RAO, 2013).

Devido à importância de receptores acoplados à proteína G nas respostas celulares aos ligantes extracelulares, eles estão entre os alvos farmacológicos mais bem-sucedidos. Estratégias de modulação alostérica desses receptores podem oferecer vantagens no desenvolvimento de agentes terapêuticos, que incluem o potencial de alcançar uma maior seletividade ao receptor, a modulação da atividade de neurotransmissores endógenos de uma maneira que mantém os sistemas de regulação intrínseca de liberação de neurotransmissores e de sinalização celular, mantendo um estado fisiológico mais natural e reduzindo a chance de efeitos adversos ou problemas associados à dessensibilização do receptor. Adicionalmente, os moduladores alostéricos tem o potencial de modular seletivamente a capacidade dos agonistas para estabilizar conformações ativas específicas do receptor e, desse modo, introduzir um viés de estímulo que induz efeitos em vias de sinalização específicas do agonista endógeno (CONN et al., 2014; GREGORY; NOETZEL; NISWENDER, 2013).

No contexto de moduladores alostéricos, o CDPBB foi capaz de reverter déficits de memória em 2 momentos diferentes no modelo de injeção, tanto iniciando o tratamento no mesmo dia da injeção da A β quanto uma semana depois, demonstrando potencial, portanto, não apenas de impedir alterações, mas de promover melhoras em um cérebro já alterado. Dessa forma, decidimos avaliar seu efeito nos animais T41 em uma fase em que já há intensa deposição de placas amiloides nesses animais (ROCKENSTEIN et al., 2001), com alterações fisiopatológicas e declínio cognitivo. Aos 14 meses, encontramos déficits de memória, diminuição de neurônios e aumento de micróglia e astrócitos, importantes para a caracterização da patologia. Ao mesmo tempo, por ser um modelo transgênico apenas para a APP, a progressão pode ser mais lenta do que em modelos que também apresentam outras mutações que induzem características presentes na doença (LI, C. et al., 2013).

Ao comparar os resultados obtidos com o tratamento com CDPBB nos dois modelos desse estudo, devemos levar em consideração que o modelo transgênico mimetiza o acúmulo de A β presente na DA em todo o encéfalo, e não apenas em uma

região específica (ROCKENSTEIN et al., 2001). Dessa forma, uma terapia que possa modificar o curso da doença precisa de uma duração maior. O estudo por 28 dias foi suficiente para detecção de algumas melhoras importantes em relação à viabilidade celular e gliose, mas não para modificar completamente as características fisiopatológicas da doença, inclusive não foi capaz de alterar a quantidade de A β no hipocampo e no córtex pré-frontal e melhorar a cognição. Portanto, estudos em outros modelos transgênicos da DA e com tempo de duração maior podem ser conduzidos para permitir a avaliação dos processos plásticos induzidos por CDPPB na DA. A intervenção terapêutica em fases mais iniciais das alterações patológicas, bem como em fases mais tardias, permitiria a avaliação do efeito protetor, bem como do efeito terapêutico mimetizando uma fase avançada da doença.

6 CONCLUSÃO

Demonstramos que o CDPPB, um modulador alostérico positivo do mGluR5, previne os déficits de memória induzidos por A β , mas não em modelo transgênico da DA. Essa prevenção apenas frente ao estímulo com A β pode ser dependente da extensão da lesão e do tempo de tratamento, que, se prolongado, poderia trazer efeitos benéficos também para o modelo transgênico. O mecanismo neuroprotetor da droga parece estar associado à prevenção de morte neuronal, ao aumento dos níveis de BDNF hipocampal e à prevenção da microgliose e astrocitose. Como um modulador alostérico, ele pode ser capaz de favorecer a ativação de vias protetoras ao potencializar a atividade de mGluR5. Além disso, a droga não induz alterações lipídicas e hepatotoxicidade nos testes realizados, o que é de extrema importância devido aos efeitos adversos observados para diferentes drogas utilizadas na clínica. Dessa forma, o CDPPB demonstra potencial para o tratamento dos sintomas associados à DA, sendo, entretanto, necessária a continuidade do estudo dos seus mecanismos de ação e de seu papel benéfico em diferentes modelos, fases da doença e tempos de tratamento.

REFERÊNCIAS

ABBASI, J. Plasma Biomarkers Predict Brain Amyloid-beta Burden. **JAMA**, v. 319, n. 10, p. 972, Mar 13 2018.

ABE, T. et al. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. **J Biol Chem**, v. 267, n. 19, p. 13361-8, Jul 5 1992.

AHMAD, A. et al. Neuroprotective Effect of Fisetin Against Amyloid-Beta-Induced Cognitive/Synaptic Dysfunction, Neuroinflammation, and Neurodegeneration in Adult Mice. **Mol Neurobiol**, Mar 5 2016.

ALBERDI, E. et al. Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. **Cell Calcium**, v. 47, n. 3, p. 264-72, Mar 2010.

ALBERT, M. S. et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, v. 7, n. 3, p. 270-9, May 2011.

ALI, T. et al. Natural Dietary Supplementation of Anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 Pathways Mitigate Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Mol Neurobiol**, Nov 23 2017.

ALZHEIMER'S, A. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v. 7, n. 2, p. 208-44, Mar 2011.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2017. Disponível em: < <http://www.alz.org/> >.

APOSTOLOVA, L. G. et al. Risk factors for behavioral abnormalities in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 37, n. 5-6, p. 315-26, 2014.

ARAI, H. et al. [The trend of developing new disease-modifying drugs in Alzheimer's disease]. **Nihon Rinsho**, v. 74, n. 3, p. 411-6, Mar 2016.

ARIF, M. et al. Effects of memantine on soluble Alphabeta(25-35)-induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's disease model rat brain regions. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 1199-209, Dec 15 2009.

ARIF, M. et al. Tau pathology involves protein phosphatase 2A in parkinsonism-dementia of Guam. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 3, p. 1144-9, Jan 21 2014.

ARIZONO, M.; BANNAI, H.; MIKOSHIBA, K. Imaging mGluR5 dynamics in astrocytes using quantum dots. **Curr Protoc Neurosci**, v. 66, p. Unit 2 21, Jan 15 2014.

ASO, E. et al. Cannabis-based medicine reduces multiple pathological processes in AbetaPP/PS1 mice. **J Alzheimers Dis**, v. 43, n. 3, p. 977-91, 2015.

AYALA, J. E. et al. mGluR5 positive allosteric modulators facilitate both hippocampal LTP and LTD and enhance spatial learning. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 9, p. 2057-71, Aug 2009.

BALDUCCI, C.; FORLONI, G. APP transgenic mice: their use and limitations. **Neuromolecular Med**, v. 13, n. 2, p. 117-37, Jun 2011.

BALES, K. R. The value and limitations of transgenic mouse models used in drug discovery for Alzheimer's disease: an update. **Expert Opin Drug Discov**, v. 7, n. 4, p. 281-97, Apr 2012.

BALSCHUN, D. et al. Interleukin-6: a cytokine to forget. **FASEB J**, v. 18, n. 14, p. 1788-90, Nov 2004.

BAMBERGER, M. E. et al. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. **J Neurosci**, v. 23, n. 7, p. 2665-74, Apr 1 2003.

BARRON, A. M.; PIKE, C. J. Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 4, p. 976-97, Jan 1 2012.

BARRY, A. E. et al. Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. **J Neurosci**, v. 31, n. 20, p. 7259-63, May 18 2011.

BATE, C.; WILLIAMS, A. Amyloid-beta-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. **J Biol Chem**, v. 286, n. 44, p. 37955-63, Nov 4 2011.

BATISTA, E. M. et al. Orchestrated activation of mGluR5 and CB1 promotes neuroprotection. **Mol Brain**, v. 9, n. 1, p. 80, Aug 20 2016.

BAUDE, A. et al. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. **Neuron**, v. 11, n. 4, p. 771-87, Oct 1993.

BAXTER, P. S. et al. Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. **Nat Commun**, v. 6, p. 6761, 2015.

BELLOZI, P. M. et al. Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BEZ235 (dactolisib) on amyloid-beta 1-42 induced neurotoxicity and memory impairment. **Sci Rep**, v. 6, p. 25226, May 4 2016.

BERNAL-MONDRAGON, C. et al. Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A-beta 25-35 injection in hippocampus. **BMC Neurosci**, v. 14, p. 104, 2013.

BIUNDO, F. et al. A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 3184, Feb 16 2018.

BLOOM, G. S. Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. **JAMA Neurol**, v. 71, n. 4, p. 505-8, Apr 2014.

BRADBURY, M. J. et al. Metabotropic glutamate receptor mGlu5 is a mediator of appetite and energy balance in rats and mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 313, n. 1, p. 395-402, Apr 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRODY, A. H.; STRITTMATTER, S. M. Synaptotoxic Signaling by Amyloid Beta Oligomers in Alzheimer's Disease Through Prion Protein and mGluR5. **Adv Pharmacol**, v. 82, p. 293-323, 2018.

BROUILLETTE, J. The effects of soluble Abeta oligomers on neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 15, p. 2506-19, 2014.

BYRNES, K. R. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. **Glia**, v. 57, n. 5, p. 550-60, Apr 1 2009.

BYRNES, K. R. et al. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 improves recovery after spinal cord injury in rodents. **Ann Neurol**, v. 66, n. 1, p. 63-74, Jul 2009.

CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 965-73, May 2011.

- CANAS, P. M. et al. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **J Neurosci**, v. 29, n. 47, p. 14741-51, Nov 25 2009.
- CAO, C. et al. Abeta-specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. **Neurobiol Dis**, v. 34, n. 1, p. 63-70, Apr 2009.
- CARLESIMO, G. A. et al. Atrophy of presubiculum and subiculum is the earliest hippocampal anatomical marker of Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement (Amst)**, v. 1, n. 1, p. 24-32, Mar 2015.
- CARMONA, S.; HARDY, J.; GUERREIRO, R. The genetic landscape of Alzheimer disease. **Handb Clin Neurol**, v. 148, p. 395-408, 2018.
- CASTELLO, N. A.; GREEN, K. N.; LAFERLA, F. M. Genetic knockdown of brain-derived neurotrophic factor in 3xTg-AD mice does not alter Abeta or tau pathology. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e39566, 2012.
- CHAKRABARTY, P. et al. Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. **Mol Neurodegener**, v. 7, p. 36, Jul 29 2012.
- CHANA, G. et al. Decreased expression of mGluR5 within the dorsolateral prefrontal cortex in autism and increased microglial number in mGluR5 knockout mice: Pathophysiological and neurobehavioral implications. **Brain Behav Immun**, v. 49, p. 197-205, Oct 2015.
- CHEN, L. et al. DMXB (GTS-21) ameliorates the cognitive deficits in beta amyloid(25-35(-)) injected mice through preventing the dysfunction of alpha7 nicotinic receptor. **J Neurosci Res**, v. 88, n. 8, p. 1784-94, Jun 2010.
- COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Curr Neuropharmacol**, v. 11, n. 3, p. 315-35, May 2013.
- CONN, P. J. et al. Opportunities and challenges in the discovery of allosteric modulators of GPCRs for treating CNS disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 9, p. 692-708, Sep 2014.
- CORBETT, N. J. et al. Amyloid-beta induced CA1 pyramidal cell loss in young adult rats is alleviated by systemic treatment with FGL, a neural cell adhesion molecule-derived mimetic peptide. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71479, 2013.
- CORTES, N. et al. Neuroimmune Tau Mechanisms: Their Role in the Progression of Neuronal Degeneration. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 4, Mar 23 2018.

CRAS, P. et al. Neuronal and microglial involvement in beta-amyloid protein deposition in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, v. 137, n. 2, p. 241-6, Aug 1990.

CROTTI, A. et al. Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 4, p. 513-21, Apr 2014.

DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. **Br J Pharmacol**, v. 167, n. 2, p. 324-52, Sep 2012.

DE BROUWER, G.; WOLMARANS, W. Back to basics: A methodological perspective on marble-burying behavior as a screening test for psychiatric illness. **Behav Processes**, Apr 22 2018.

DE BRUIJN, R. F.; IKRAM, M. A. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. **BMC Med**, v. 12, p. 130, Nov 11 2014.

DE CALIGNON, A. et al. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 685-97, Feb 23 2012.

DE FELICE, F. G. et al. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **J Biol Chem**, v. 282, n. 15, p. 11590-601, Apr 13 2007.

DEACON, R. M.; RAWLINS, J. N. Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. **Behav Brain Res**, v. 156, n. 2, p. 241-9, Jan 30 2005.

DI FILIPPO, M. et al. Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 8, p. 402-12, Aug 2008.

DORIA, J. G. et al. The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPBB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis**, v. 73, p. 163-73, Jan 2015.

DORIA, J. G. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 4, p. 909-21, Jun 2013.

DUFF, M. C. et al. Learning in Alzheimer's disease is facilitated by social interaction. **J Comp Neurol**, v. 521, n. 18, p. 4356-69, Dec 15 2013.

EL KHOURY, J. et al. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. **Nature**, v. 382, n. 6593, p. 716-9, Aug 22 1996.

ELDER, G. A.; GAMA SOSA, M. A.; DE GASPERI, R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Mt Sinai J Med**, v. 77, n. 1, p. 69-81, Jan-Feb 2010.

ELETI, S. Drugs in Alzheimer's disease Dementia: An overview of current pharmacological management and future directions. **Psychiatr Danub**, v. 28, n. Suppl-1, p. 136-140, Sep 2016.

ERICHSEN, J. L. et al. Group I metabotropic glutamate receptors: a potential target for regulation of proliferation and differentiation of an immortalized human neural stem cell line. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 116, n. 4, p. 329-36, Apr 2015.

ERTA, M.; QUINTANA, A.; HIDALGO, J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9, p. 1254-66, 2012.

ESTER ASO, I. F. Potential Therapeutic Strategies to Prevent the Progression of Alzheimer to Disease States. In: INTECHOPEN (Ed.). **Understanding Alzheimer's Disease**, 2013.

EVANS, C. et al. A rapidly acquired foraging-based working memory task, sensitive to hippocampal lesions, reveals age-dependent and age-independent behavioural changes in a mouse model of amyloid pathology. **Neurobiol Learn Mem**, v. 149, p. 46-57, Mar 2018.

FAIZI, M. et al. Thy1-hAPP(Lond/Swe+) mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function. **Brain Behav**, v. 2, n. 2, p. 142-54, Mar 2012.

FERNANDEZ, P. L.; BRITTON, G. B.; RAO, K. S. Potential immunotargets for Alzheimer's disease treatment strategies. **J Alzheimers Dis**, v. 33, n. 2, p. 297-312, 2013.

FIEST, K. M. et al. The Prevalence and Incidence of Dementia Due to Alzheimer's Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Can J Neurol Sci**, v. 43 Suppl 1, p. S51-82, Apr 2016.

FOWLER, S. W. et al. Functional interaction of mGlu5 and NMDA receptors in aversive learning in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 95, n. 1, p. 73-9, Jan 2011.

FOWLER, S. W. et al. Effects of a metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator, CDPPB, on spatial learning task performance in rodents. **Neurobiol Learn Mem**, v. 99, p. 25-31, Jan 2013.

FUNG, L. K.; HARDAN, A. Y. Developing Medications Targeting Glutamatergic Dysfunction in Autism: Progress to Date. **CNS Drugs**, v. 29, n. 6, p. 453-63, Jun 2015.

FURUKAWA-HIBI, Y. et al. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid-beta peptide in mice. **Behav Brain Res**, v. 225, n. 1, p. 222-9, Nov 20 2011.

GALANI, R. et al. Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. **Behav Brain Res**, v. 96, n. 1-2, p. 1-12, Nov 1998.

GEERTS, H.; GROSSBERG, G. T. Pharmacology of acetylcholinesterase inhibitors and N-methyl-D-aspartate receptors for combination therapy in the treatment of Alzheimer's disease. **J Clin Pharmacol**, v. 46, n. 7 Suppl 1, p. 8S-16S, Jul 2006.

GEORGE PAXINOS, K. B. J. F. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. Second. ACADEMIC PRESS, 2001. 296 ISBN 978-0125476379.

GIOVANNINI, M. G. et al. Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. **Neurobiol Dis**, v. 11, n. 2, p. 257-74, Nov 2002.

GOTZ, J.; ITTNER, L. M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 7, p. 532-44, Jul 2008.

GREENFIELD, S. Discovering and targeting the basic mechanism of neurodegeneration: the role of peptides from the C-terminus of acetylcholinesterase: non-hydrolytic effects of ache: the actions of peptides derived from the C-terminal and their relevance to neurodegeneration. **Chem Biol Interact**, v. 203, n. 3, p. 543-6, May 25 2013.

GREGORY, K. J.; NOETZEL, M. J.; NISWENDER, C. M. Pharmacology of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators: structural basis and therapeutic potential for CNS disorders. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 115, p. 61-121, 2013.

GRIMM, M. O. et al. Neprilysin and Aβ Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. **Front Aging Neurosci**, v. 5, p. 98, 2013.

GUAN, D. F. et al. The mGluR5 positive allosteric modulator CDPBB inhibits SO(2)-induced protein radical formation and mitochondrial dysfunction through activation of

Akt in mouse hippocampal HT22 cells. **Cell Mol Neurobiol**, v. 35, n. 4, p. 573-83, May 2015.

HAAS, L. T. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 couples cellular prion protein to intracellular signalling in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 139, n. Pt 2, p. 526-46, Feb 2016.

HAAS, L. T. et al. Silent Allosteric Modulation of mGluR5 Maintains Glutamate Signaling while Rescuing Alzheimer's Mouse Phenotypes. **Cell Rep**, v. 20, n. 1, p. 76-88, Jul 5 2017.

HAMBY, M. E. et al. Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. **J Neurosci**, v. 32, n. 42, p. 14489-510, Oct 17 2012.

HAMILTON, A. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout reduces cognitive impairment and pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. **Mol Brain**, v. 7, p. 40, May 29 2014.

HAMILTON, A. et al. Chronic Pharmacological mGluR5 Inhibition Prevents Cognitive Impairment and Reduces Pathogenesis in an Alzheimer Disease Mouse Model. **Cell Rep**, v. 15, n. 9, p. 1859-65, May 31 2016.

HAMPEL, H. et al. In vivo imaging of region and cell type specific neocortical neurodegeneration in Alzheimer's disease. Perspectives of MRI derived corpus callosum measurement for mapping disease progression and effects of therapy. Evidence from studies with MRI, EEG and PET. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 109, n. 5-6, p. 837-55, May 2002.

HENEKA, M. T. Macrophages derived from infiltrating monocytes mediate autoimmune myelin destruction. **J Exp Med**, v. 211, n. 8, p. 1500, Jul 28 2014.

HICKMAN, S. E.; ALLISON, E. K.; EL KHOURY, J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. **J Neurosci**, v. 28, n. 33, p. 8354-60, Aug 13 2008.

HOLM, T. H.; DRAEBY, D.; OWENS, T. Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. **Glia**, v. 60, n. 4, p. 630-8, Apr 2012.

HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J. C.; GOATE, A. M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 77, p. 77sr1, Apr 6 2011.

HORIO, M.; FUJITA, Y.; HASHIMOTO, K. Therapeutic effects of metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator CDPPEB on phencyclidine-induced cognitive deficits in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, n. 5, p. 483-8, Oct 2013.

HSIAO, Y. H. et al. Social interaction rescues memory deficit in an animal model of Alzheimer's disease by increasing BDNF-dependent hippocampal neurogenesis. **J Neurosci**, v. 34, n. 49, p. 16207-19, Dec 3 2014.

HU, N. W. et al. mGlu5 receptors and cellular prion protein mediate amyloid-beta-facilitated synaptic long-term depression in vivo. **Nat Commun**, v. 5, p. 3374, Mar 4 2014.

HU, Z. et al. Ovarian hormones ameliorate memory impairment, cholinergic deficit, neuronal apoptosis and astrogliosis in a rat model of Alzheimer's disease. **Exp Ther Med**, v. 11, n. 1, p. 89-97, Jan 2016.

HUANG, H. et al. Characterization of AD-like phenotype in aged APPSwe/PS1dE9 mice. **Age (Dordr)**, v. 38, n. 4, p. 303-322, Aug 2016.

HUANG, X. et al. Salubrinal attenuates beta-amyloid-induced neuronal death and microglial activation by inhibition of the NF-kappaB pathway. **Neurobiol Aging**, v. 33, n. 5, p. 1007 e9-17, May 2012.

HURLEY, L. L.; TIZABI, Y. Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. **Neurotox Res**, v. 23, n. 2, p. 131-44, Feb 2013.

IMTIAZ, B. et al. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. **Biochem Pharmacol**, v. 88, n. 4, p. 661-70, Apr 15 2014.

JACK, C. R., JR. et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, v. 7, n. 3, p. 257-62, May 2011.

JANOTA, C. S. et al. Gliovascular changes during ageing in wild-type and Alzheimer's disease-like APP/PS1 mice. **Brain Res**, v. 1620, p. 153-68, Sep 16 2015.

JAWHAR, S. et al. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 33, n. 1, p. 196 e29-40, Jan 2012.

JEON, S. G. et al. Visualization of Altered Hippocampal Connectivity in an Animal Model of Alzheimer's Disease. **Mol Neurobiol**, Feb 27 2018.

JIA, Q.; DENG, Y.; QING, H. Potential therapeutic strategies for Alzheimer's disease targeting or beyond beta-amyloid: insights from clinical trials. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 837157, 2014.

JIANG, S. et al. Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. **Mol Neurodegener**, v. 9, p. 6, 2014.

JIN, J. J. et al. Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 23, May 29 2008.

JIN, Y. et al. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. **Acta Pharmacol Sin**, v. 26, n. 8, p. 943-51, Aug 2005.

KALLOP, D. Y. et al. A death receptor 6-amyloid precursor protein pathway regulates synapse density in the mature CNS but does not contribute to Alzheimer's disease-related pathophysiology in murine models. **J Neurosci**, v. 34, n. 19, p. 6425-37, May 7 2014.

KALRA, J. et al. Modulation of LOX and COX pathways via inhibition of amyloidogenesis contributes to mitoprotection against beta-amyloid oligomer-induced toxicity in an animal model of Alzheimer's disease in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 146-147, p. 1-12, Jul-Aug 2016.

KARROUCHI, K. et al. Synthesis and Pharmacological Activities of Pyrazole Derivatives: A Review. **Molecules**, v. 23, n. 1, Jan 12 2018.

KEDIA, S.; CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **J Neurosci Methods**, v. 233, p. 150-4, Aug 15 2014.

KELLY, P. et al. Microvascular ultrastructural changes precede cognitive impairment in the murine APP^{swe}/PS1^{dE9} model of Alzheimer's disease. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 567-580, Nov 2017.

KENNEDY, M. B. Synaptic Signaling in Learning and Memory. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 8, n. 2, p. a016824, Dec 30 2013.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiol Rev**, v. 91, n. 2, p. 461-553, Apr 2011.

KHOURY, R. et al. Recent Progress in the Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease. **Drugs Aging**, v. 34, n. 11, p. 811-820, Nov 2017.

KHOURY, R.; RAJAMANICKAM, J.; GROSSBERG, G. T. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. **Ther Adv Drug Saf**, v. 9, n. 3, p. 171-178, Mar 2018.

KIM, T. K. et al. Expression of the plant viral protease N1a in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease mitigates A β pathology and improves cognitive function. **Exp Mol Med**, v. 44, n. 12, p. 740-8, Dec 31 2012.

KINNEY, G. G. et al. A novel selective positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor subtype 5 has in vivo activity and antipsychotic-like effects in rat behavioral models. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 313, n. 1, p. 199-206, Apr 2005.

KIYOTA, T. et al. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. **FASEB J**, v. 24, n. 8, p. 3093-102, Aug 2010.

KNOWLES, J. K. et al. Small molecule p75^{NTR} ligand prevents cognitive deficits and neurite degeneration in an Alzheimer's mouse model. **Neurobiol Aging**, v. 34, n. 8, p. 2052-63, Aug 2013.

KOCAHAN, S.; DOGAN, Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. **Clin Psychopharmacol Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 1-8, Feb 28 2017.

KOSTIC, M. et al. IL-17 and glutamate excitotoxicity in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Scand J Immunol**, v. 79, n. 3, p. 181-6, Mar 2014.

KOSTIC, M. et al. IL-17 signalling in astrocytes promotes glutamate excitotoxicity: Indications for the link between inflammatory and neurodegenerative events in multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord**, v. 11, p. 12-17, Jan 2017.

KRABBE, G. et al. Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60921, 2013.

KUDO, W. et al. Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid-beta-induced neuronal cell death. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 5, p. 1138-44, Mar 1 2012.

KUMAR, A.; DHULL, D. K.; MISHRA, P. S. Therapeutic potential of mGluR5 targeting in Alzheimer's disease. **Front Neurosci**, v. 9, p. 215, 2015.

KUNKLE, B. W. et al. Early-Onset Alzheimer Disease and Candidate Risk Genes Involved in Endolysosomal Transport. **JAMA Neurol**, v. 74, n. 9, p. 1113-1122, Sep 1 2017.

LALONDE, R.; FUKUCHI, K.; STRAZIELLE, C. APP transgenic mice for modelling behavioural and psychological symptoms of dementia (BPSD). **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 5, p. 1357-75, May 2012.

LAMBERT, M. P. et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 6448-53, May 26 1998.

LANOISELEE, H. M. et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. **PLoS Med**, v. 14, n. 3, p. e1002270, Mar 2017.

LARSON, M. et al. The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric Abeta with pathological tau changes in Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 32, n. 47, p. 16857-71a, Nov 21 2012.

LAUREN, J. et al. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. **Nature**, v. 457, n. 7233, p. 1128-32, Feb 26 2009.

LAWS, K. R.; IRVINE, K.; GALE, T. M. Sex differences in Alzheimer's disease. **Curr Opin Psychiatry**, v. 31, n. 2, p. 133-139, Mar 2018.

LAZZARI, C. et al. Abeta42 oligomers selectively disrupt neuronal calcium release. **Neurobiol Aging**, v. 36, n. 2, p. 877-85, Feb 2015.

LEA, P. M. T.; FADEN, A. I. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists MPEP and MTEP. **CNS Drug Rev**, v. 12, n. 2, p. 149-66, Summer 2006.

LEE, H. G. et al. Amyloid-beta in Alzheimer disease: the null versus the alternate hypotheses. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 321, n. 3, p. 823-9, Jun 2007.

LEE, M. et al. Abeta pathology downregulates brain mGluR5 density in a mouse model of Alzheimer. **Neuropharmacology**, v. 133, p. 512-517, May 1 2018.

LEE, R. K. et al. Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 8083-7, Aug 15 1995.

LEGGIO, G. M. et al. The antineoplastic drug flavopiridol reverses memory impairment induced by Amyloid-ss1-42 oligomers in mice. **Pharmacol Res**, v. 106, p. 10-20, Apr 2016.

LI, C.; EBRAHIMI, A.; SCHLUESENER, H. Drug pipeline in neurodegeneration based on transgenic mice models of Alzheimer's disease. **Ageing Res Rev**, v. 12, n. 1, p. 116-40, Jan 2013.

LI, C. et al. Hesperidin ameliorates behavioral impairments and neuropathology of transgenic APP/PS1 mice. **Behav Brain Res**, v. 281, p. 32-42, Mar 15 2015.

LI, F. et al. Icarin decreases both APP and A β levels and increases neurogenesis in the brain of Tg2576 mice. **Neuroscience**, v. 304, p. 29-35, Sep 24 2015.

LI, J. et al. Protective effects of BAY 73-6691, a selective inhibitor of phosphodiesterase 9, on amyloid- β peptides-induced oxidative stress in in-vivo and in-vitro models of Alzheimer's disease. **Brain Res**, Apr 9 2016.

LI, R.; SINGH, M. Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Front Neuroendocrinol**, v. 35, n. 3, p. 385-403, Aug 2014.

LIDDELOW, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481-487, Jan 26 2017.

LIM, J. K. et al. The Eye As a Biomarker for Alzheimer's Disease. **Front Neurosci**, v. 10, p. 536, 2016.

LIMA, I. V. et al. PI3K γ deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Exp Neurol**, v. 267, p. 123-134, Mar 5 2015.

LINDSLEY, C. W. et al. Discovery of positive allosteric modulators for the metabotropic glutamate receptor subtype 5 from a series of N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamides that potentiate receptor function in vivo. **J Med Chem**, v. 47, n. 24, p. 5825-8, Nov 18 2004.

LITHNER, C. U.; HEDBERG, M. M.; NORDBERG, A. Transgenic mice as a model for Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 8, n. 8, p. 818-31, Dec 2011.

LLORET, A. et al. Molecular mechanisms linking amyloid β toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 83, p. 186-91, Jun 2015.

LOANE, D. J. et al. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. **J Biol Chem**, v. 284, n. 23, p. 15629-39, Jun 5 2009.

LOANE, D. J. et al. Novel mGluR5 positive allosteric modulator improves functional recovery, attenuates neurodegeneration, and alters microglial polarization after experimental traumatic brain injury. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 4, p. 857-69, Oct 2014.

LYONS, A. et al. Atorvastatin prevents age-related and amyloid-beta-induced microglial activation by blocking interferon-gamma release from natural killer cells in the brain. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 27, Mar 31 2011.

MA, M. T. et al. Effects of cholesterol oxidation products on exocytosis. **Neurosci Lett**, v. 476, n. 1, p. 36-41, May 26 2010.

MA, T.; KLANN, E. Amyloid beta: linking synaptic plasticity failure to memory disruption in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 120 Suppl 1, p. 140-8, Jan 2012.

MAH, L. et al. Anxiety symptoms in amnesic mild cognitive impairment are associated with medial temporal atrophy and predict conversion to Alzheimer disease. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 23, n. 5, p. 466-76, May 2015.

MARSH, S. E. et al. The adaptive immune system restrains Alzheimer's disease pathogenesis by modulating microglial function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 9, p. E1316-25, Mar 1 2016.

MARTINI, A. C. et al. Past to Future: What Animal Models Have Taught Us About Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, Feb 28 2018.

MASU, M. et al. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. **Nature**, v. 349, n. 6312, p. 760-5, Feb 28 1991.

MCKHANN, G. M. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, v. 7, n. 3, p. 263-9, May 2011.

MCLAURIN, J.; DARABIE, A. A.; MORRISON, M. R. Cholesterol, a modulator of membrane-associated Abeta-fibrillogenesis. **Pharmacopsychiatry**, v. 36 Suppl 2, p. S130-5, Sep 2003.

MENARD, C. et al. Knockdown of prodynorphin gene prevents cognitive decline, reduces anxiety, and rescues loss of group 1 metabotropic glutamate receptor function in aging. **J Neurosci**, v. 33, n. 31, p. 12792-804, Jul 31 2013.

MENDEZ, M. F. Early-Onset Alzheimer Disease. **Neurol Clin**, v. 35, n. 2, p. 263-281, May 2017.

MESQUITA, A. R. et al. IL-10 modulates depressive-like behavior. **J Psychiatr Res**, v. 43, n. 2, p. 89-97, Dec 2008.

MEUNIER, J.; IENI, J.; MAURICE, T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma₁ receptor. **Br J Pharmacol**, v. 149, n. 8, p. 998-1012, Dec 2006.

MHILLAJ, E.; CUOMO, V.; MANCUSO, C. The contribution of transgenic and nontransgenic animal models in Alzheimer's disease drug research and development. **Behav Pharmacol**, v. 28, n. 2 and 3-Spec Issue, p. 95-111, Apr 2017.

MICHALON, A. et al. Chronic pharmacological mGlu₅ inhibition corrects fragile X in adult mice. **Neuron**, v. 74, n. 1, p. 49-56, Apr 12 2012.

MOHAMMAD, D. et al. Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation. **Expert Opin Drug Saf**, v. 16, n. 9, p. 1009-1019, Sep 2017.

MOKHTAR, S. H. et al. The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2013, p. 910502, 2013.

MOLCK, C. et al. mGlu₅: exploration of orthosteric and allosteric ligand binding pockets and their applications to drug discovery. **Neurochem Res**, v. 39, n. 10, p. 1862-75, Oct 2014.

MOODLEY, K. K.; CHAN, D. The hippocampus in neurodegenerative disease. **Front Neurol Neurosci**, v. 34, p. 95-108, 2014.

MOON, M. et al. Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid-beta₁₋₄₂ oligomer-injected mice. **J Alzheimers Dis**, v. 23, n. 1, p. 147-59, 2011.

MOORTHI, P. et al. Pathological changes in hippocampal neuronal circuits underlie age-associated neurodegeneration and memory loss: positive clue toward SAD. **Neuroscience**, v. 301, p. 90-105, Aug 20 2015.

MORIMOTO, K. et al. Expression profiles of cytokines in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients compared to the brains of non-demented patients with and without increasing AD pathology. **J Alzheimers Dis**, v. 25, n. 1, p. 59-76, 2011.

MOVSESYAN, V. A.; STOICA, B. A.; FADEN, A. I. MGLuR5 activation reduces beta-amyloid-induced cell death in primary neuronal cultures and attenuates translocation of cytochrome c and apoptosis-inducing factor. **J Neurochem**, v. 89, n. 6, p. 1528-36, Jun 2004.

MURAI, T. et al. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 116-24, Jan 30 2007.

MURPHY, M. P.; LEVINE, H., 3RD. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. **J Alzheimers Dis**, v. 19, n. 1, p. 311-23, 2010.

NAERT, G.; RIVEST, S. Age-related changes in synaptic markers and monocyte subsets link the cognitive decline of APP(Swe)/PS1 mice. **Front Cell Neurosci**, v. 6, p. 51, 2012.

NAKAMURA, S. et al. Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. **Brain Res**, v. 912, n. 2, p. 128-36, Sep 7 2001.

NAVA-MESA, M. O. et al. GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stages of Alzheimer's disease. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 167, 2014.

NICKOLS, H. H.; CONN, P. J. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. **Neurobiol Dis**, v. 61, p. 55-71, Jan 2014.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 295-322, 2010.

NJOKU, D. B. Drug-induced hepatotoxicity: metabolic, genetic and immunological basis. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 4, p. 6990-7003, Apr 22 2014.

ODDO, S. et al. Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. **J Biol Chem**, v. 281, n. 3, p. 1599-604, Jan 20 2006.

OLIVEIRA, B. C. L. et al. Inflammation as a Possible Link Between Dyslipidemia and Alzheimer's Disease. **Neuroscience**, v. 376, p. 127-141, Apr 15 2018.

OLMO, I. G.; FERREIRA-VIEIRA, T. H.; RIBEIRO, F. M. Dissecting the Signaling Pathways Involved in the Crosstalk between Metabotropic Glutamate 5 and Cannabinoid Type 1 Receptors. **Mol Pharmacol**, v. 90, n. 5, p. 609-619, Nov 2016.

OSTAPCHENKO, V. G. et al. The prion protein ligand, stress-inducible phosphoprotein 1, regulates amyloid-beta oligomer toxicity. **J Neurosci**, v. 33, n. 42, p. 16552-64, Oct 16 2013.

OVERK, C. R.; MASLIAH, E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. **Biochem Pharmacol**, v. 88, n. 4, p. 508-16, Apr 15 2014.

OW, S. Y.; DUNSTAN, D. E. A brief overview of amyloids and Alzheimer's disease. **Protein Sci**, v. 23, n. 10, p. 1315-31, Oct 2014.

PARSONS, C. G. et al. Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. **Neurotox Res**, v. 24, n. 3, p. 358-69, Oct 2013.

PASSOS, G. F. et al. Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1-40 peptide in mice. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 3, p. 493-501, Mar 2010.

PATEL, L.; GROSSBERG, G. T. Combination therapy for Alzheimer's disease. **Drugs Aging**, v. 28, n. 7, p. 539-46, Jul 1 2011.

PEINEAU, S. et al. Synaptic plasticity modulation by circulating peptides and metaplasticity: Involvement in Alzheimer's disease. **Pharmacol Res**, v. 130, p. 385-401, Apr 2018.

PENSALFINI, A. et al. Intracellular amyloid and the neuronal origin of Alzheimer neuritic plaques. **Neurobiol Dis**, v. 71, p. 53-61, Nov 2014.

PETITTO, J. M.; MEOLA, D.; HUANG, Z. Interleukin-2 and the brain: dissecting central versus peripheral contributions using unique mouse models. **Methods Mol Biol**, v. 934, p. 301-11, 2012.

PHILLIPS, E. C. et al. Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Biochem Soc Trans**, v. 42, n. 5, p. 1321-5, Oct 2014.

PIN, J. P.; DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1-26, Jan 1995.

PLOJ, K. et al. The metabotropic glutamate mGluR5 receptor agonist CHPG stimulates food intake. **Neuroreport**, v. 21, n. 10, p. 704-8, Jul 14 2010.

POVOVA, J. et al. Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 156, n. 2, p. 108-14, Jun 2012.

PREDIGER, R. D. et al. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res**, v. 177, n. 2, p. 205-13, Feb 27 2007.

PRINCE, M. C.-H., ADELINA ADELINA; KNAPP, MARTIN; GUERCHET, MAËLENN; KARAGIANNIDOU, MARIA. **World Alzheimer Report 2016. Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, quality and costs now and in the future**. London. 2016

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 329-44, Jan 28 2010.

RAJENDRAN, L.; PAOLICELLI, R. C. Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. **J Neurosci**, v. 38, n. 12, p. 2911-2919, Mar 21 2018.

REEVE, E. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations in older people with dementia. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 13, n. 6, p. 651-668, Jun 2017.

REGEV, A. Drug-induced liver injury and drug development: industry perspective. **Semin Liver Dis**, v. 34, n. 2, p. 227-39, May 2014.

REICHEL, C. M. et al. Loss of object recognition memory produced by extended access to methamphetamine self-administration is reversed by positive allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 782-92, Mar 2011.

RENNER, M. et al. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. **Neuron**, v. 66, n. 5, p. 739-54, Jun 10 2010.

RIBEIRO, F. M. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes motor and biochemical alterations in a mouse model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet**, v. 23, n. 8, p. 2030-42, Apr 15 2014.

RIBEIRO, F. M. et al. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci**, v. 30, n. 1, p. 316-24, Jan 6 2010.

RITZEN, A.; MATHIESEN, J. M.; THOMSEN, C. Molecular pharmacology and therapeutic prospects of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 97, n. 4, p. 202-13, Oct 2005.

ROBERSON, E. D.; MUCKE, L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. **Science**, v. 314, n. 5800, p. 781-4, Nov 3 2006.

ROBINSON, A. et al. Upregulation of PGC-1 α expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. **Ageing Cell**, v. 13, n. 2, p. 263-72, Apr 2014.

ROCKENSTEIN, E. et al. Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of Abeta(1-42). **J Neurosci Res**, v. 66, n. 4, p. 573-82, Nov 15 2001.

RODRIGUEZ-VIEITEZ, E. et al. Diverging longitudinal changes in astrogliosis and amyloid PET in autosomal dominant Alzheimer's disease. **Brain**, v. 139, n. Pt 3, p. 922-36, Mar 2016.

RONDARD, P.; PIN, J. P. Dynamics and modulation of metabotropic glutamate receptors. **Curr Opin Pharmacol**, v. 20, p. 95-101, Feb 2015.

ROY, D. S. et al. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. **Nature**, v. 531, n. 7595, p. 508-12, Mar 24 2016.

RUAN, C. S. et al. Sortilin inhibits amyloid pathology by regulating non-specific degradation of APP. **Exp Neurol**, v. 299, n. Pt A, p. 75-85, Jan 2018.

RUBIO-PEREZ, J. M.; MORILLAS-RUIZ, J. M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 756357, 2012.

RUTHIRAKUHAN, M. et al. Beyond immunotherapy: new approaches for disease modifying treatments for early Alzheimer's disease. **Expert Opin Pharmacother**, v. 17, n. 18, p. 2417-2429, Dec 2016.

SANPHUI, P.; BISWAS, S. C. FoxO3a is activated and executes neuron death via Bim in response to beta-amyloid. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e625, 2013.

SCHMUED, L. C.; ALBERTSON, C.; SLIKKER, W., JR. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Res**, v. 751, n. 1, p. 37-46, Mar 14 1997.

SCHMUED, L. C. et al. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res**, v. 1035, n. 1, p. 24-31, Feb 21 2005.

SCHWAB, C.; HOSOKAWA, M.; MCGEER, P. L. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. **Exp Neurol**, v. 188, n. 1, p. 52-64, Jul 2004.

SCHWARTZ, N. E.; ALFORD, S. Physiological activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors increases intracellular calcium and glutamate release. **J Neurophysiol**, v. 84, n. 1, p. 415-27, Jul 2000.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 789-91, Oct 25 2002.

SHAMPO, M. A.; KYLE, R. A.; STEENSMA, D. P. Alois Alzheimer--Alzheimer disease. **Mayo Clin Proc**, v. 88, n. 12, p. e155, Dec 2013.

SHARIATPANAHI, M. et al. The involvement of PKG inhibitor in regulation of apoptosis and autophagy markers in spatial memory deficit induced by Abeta. **Fundam Clin Pharmacol**, Mar 15 2016.

SHE, W. C. et al. Roles of mGluR5 in synaptic function and plasticity of the mouse thalamocortical pathway. **Eur J Neurosci**, v. 29, n. 7, p. 1379-96, Apr 2009.

SHIGEMOTO, R. et al. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. **Neurosci Lett**, v. 163, n. 1, p. 53-7, Nov 26 1993.

SONG, J. H.; YU, J. T.; TAN, L. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy. **Mol Neurobiol**, v. 52, n. 3, p. 1477-1493, Dec 2015.

SPECIALE, L. et al. Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. **Neurobiol Aging**, v. 28, n. 8, p. 1163-9, Aug 2007.

SPILLANTINI, M. G.; GOEDERT, M. Tau pathology and neurodegeneration. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 6, p. 609-22, Jun 2013.

STEFANI, M. R.; MOGHADDAM, B. Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors attenuates deficits in cognitive flexibility induced by NMDA receptor blockade. **Eur J Pharmacol**, v. 639, n. 1-3, p. 26-32, Aug 10 2010.

STEFANOVA, N. A. et al. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. **Cell Cycle**, v. 13, n. 6, p. 898-909, 2014.

STEWART, C. R. et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. **Nat Immunol**, v. 11, n. 2, p. 155-61, Feb 2010.

SU, W. N. et al. An efficient one-pot synthesis of N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)amides. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 7, 10 July 2010 2010.

SUBRAMANIAM, M. et al. Prevalence of Dementia in People Aged 60 Years and Above: Results from the WiSE Study. **J Alzheimers Dis**, v. 45, n. 4, p. 1127-38, 2015.

TANQUEIRO, S. R. et al. Inhibition of NMDA Receptors Prevents the Loss of BDNF Function Induced by Amyloid beta. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 237, 2018.

TEIXEIRA, C. M. et al. Untold New Beginnings: Adult Hippocampal Neurogenesis and Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, Mar 16 2018.

TEIXEIRA, J. B. et al. Mortality from Alzheimer's disease in Brazil, 2000-2009. **Cad Saude Publica**, v. 31, n. 4, p. 850-60, Apr 2015.

THATHIAH, A.; DE STROOPER, B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 2, p. 73-87, Feb 2011.

TORRES-LISTA, V.; LOPEZ-POUSA, S.; GIMENEZ-LLORT, L. Marble-burying is enhanced in 3xTg-AD mice, can be reversed by risperidone and it is modulable by handling. **Behav Processes**, v. 116, p. 69-74, Jul 2015.

UM, J. W. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. **Neuron**, v. 79, n. 5, p. 887-902, Sep 4 2013.

UM, J. W. et al. Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 9, p. 1227-35, Sep 2012.

USLANER, J. M. et al. Dose-dependent effect of CDPBB, the mGluR5 positive allosteric modulator, on recognition memory is associated with GluR1 and CREB phosphorylation in the prefrontal cortex and hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 5-6, p. 531-8, Oct-Nov 2009.

VEST, R. S.; PIKE, C. J. Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. **Horm Behav**, v. 63, n. 2, p. 301-7, Feb 2013.

VITNER, E. B. et al. RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. **Nat Med**, v. 20, n. 2, p. 204-8, Feb 2014.

VITUREIRA, N.; GODA, Y. Cell biology in neuroscience: the interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. **J Cell Biol**, v. 203, n. 2, p. 175-86, Oct 28 2013.

WALKER, D. G.; LUE, L. F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. **Alzheimers Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 56, Aug 19 2015.

WALSH, D. M. et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 535-9, Apr 4 2002.

WANG, L. et al. Iron enhances the neurotoxicity of amyloid beta. **Transl Stroke Res**, v. 3, n. 1, p. 107-13, Mar 2012.

WANG, M. et al. Honokiol Attenuates Oligomeric Amyloid beta1-42-Induced Alzheimer's Disease in Mice Through Attenuating Mitochondrial Apoptosis and Inhibiting the Nuclear Factor Kappa-B Signaling Pathway. **Cell Physiol Biochem**, v. 43, n. 1, p. 69-81, 2017.

WANG, Y. Q.; QU, D. H.; WANG, K. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through stimulating of non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 11, p. 2389-403, Jun 2016.

WEBSTER, S. D. et al. The mouse C1q A-chain sequence alters beta-amyloid-induced complement activation. **Neurobiol Aging**, v. 20, n. 3, p. 297-304, May-Jun 1999.

WILBERDING, A. et al. Multiple cytokines are involved in the early events leading to the Alzheimer's disease pathology. **Tottori Rinsho Kagaku Kenkyukai Shi**, v. 1, n. 2, p. 359-373, 2008.

WILCOCK, D. M. et al. Diverse inflammatory responses in transgenic mouse models of Alzheimer's disease and the effect of immunotherapy on these responses. **ASN Neuro**, v. 3, n. 5, p. 249-58, Nov 30 2011.

WINSLOW, B. T. et al. Treatment of Alzheimer disease. **Am Fam Physician**, v. 83, n. 12, p. 1403-12, Jun 15 2011.

WITTNAM, J. L. et al. Pyroglutamate amyloid beta (A β) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. **J Biol Chem**, v. 287, n. 11, p. 8154-62, Mar 9 2012.

WYSS-CORAY, T. et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. **Nat Med**, v. 9, n. 4, p. 453-7, Apr 2003.

XU, T. H. et al. Alzheimer's disease-associated mutations increase amyloid precursor protein resistance to gamma-secretase cleavage and the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio. **Cell Discov**, v. 2, p. 16026, 2016.

XUE, F. et al. Positive allosteric modulators (PAMs) of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) attenuate microglial activation. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 558-66, 2014.

YE, J.; ZHANG, Y. Curcumin protects against intracellular amyloid toxicity in rat primary neurons. **Int J Clin Exp Med**, v. 5, n. 1, p. 44-9, 2012.

YIN, Z. et al. Immune hyperreactivity of A β plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 55, p. 115-122, Jul 2017.

ZAMANIAN, J. L. et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. **J Neurosci**, v. 32, n. 18, p. 6391-410, May 2 2012.

ZENG, Y. Q. et al. Scutellarin Mitigates A β -Induced Neurotoxicity and Improves Behavior Impairments in AD Mice. **Molecules**, v. 23, n. 4, Apr 10 2018.

ZHANG, J. et al. Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of a β ₁₋₄₂-induced Alzheimer's disease model rats. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75786, 2013.

ZHANG, Y. Y. et al. Atorvastatin attenuates the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β ₁₋₄₂-induced rat model of Alzheimer's disease. **Clin Interv Aging**, v. 8, p. 103-10, 2013.

ZHANG, Z. Y. et al. Activation of mGluR5 Attenuates Microglial Activation and Neuronal Apoptosis in Early Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats. **Neurochem Res**, v. 40, n. 6, p. 1121-32, Jun 2015.

ZHAO, L. et al. mGluR5 promotes the differentiation of rat neural progenitor cells into cholinergic neurons and activation of extracellular signal-related protein kinases. **Neuroreport**, v. 25, n. 6, p. 427-34, Apr 16 2014.

ZHOU, L. et al. Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic dysfunction. **Nat Commun**, v. 8, p. 15295, May 11 2017.

ZHU, L. et al. A novel phosphodiesterase-5 Inhibitor: Yonkenafil modulates neurogenesis, gliosis to improve cognitive function and ameliorates amyloid burden in an APP/PS1 transgenic mice model. **Mech Ageing Dev**, v. 150, p. 34-45, Sep 2015.

ZIMMERMANN, J. et al. CNS-targeted production of IL-17A induces glial activation, microvascular pathology and enhances the neuroinflammatory response to systemic endotoxemia. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57307, 2013.