

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia**

Izabella Bárbara Quirino de Lima

**O PAPEL DO MGLUR5 NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA  
PODA SINÁPTICA EM UM MODELO MURINO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Belo Horizonte  
2019

Izabella Bárbara Quirino de Lima

**O PAPEL DO MGLUR5 NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA  
PODA SINÁPTICA EM UM MODELO MURINO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Bioquímica e Imunologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Fabiola M. Ribeiro

**Coorientador:** Prof. Dr. Antônio Carlos  
Pinheiro de Oliveira

Belo Horizonte

2019

043

Lima, Izabella Bárbara Quirino de.

O papel do MGLUR5 na expressão de proteínas envolvidas na poda sináptica em um modelo murino da Doença de Alzheimer [manuscrito] / Izabella Bárbara Quirino de Lima. – 2019.

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

Orientadora: Profa. Dra. Fabiola M. Ribeiro. Coorientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Doença de Alzheimer. 3. Receptor de Glutamato Metabotrópico 5. 4. Quimiocina CX3CL1. 5. Proteínas do Sistema Complemento. I. Ribeiro, Fabiola Mara. II. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE IZABELLA BÁRBARA QUIRINO DE LIMA**, orientada pela Profa. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Mara Ribeiro. Aos nove dias do mês de julho de 2019 às 09h00min horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "" O papel do mGluR5 na expressão de proteínas envolvidas na poda sináptica em um modelo murino da doença de Alzheimer", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Helton José dos Reis (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rafael Pinto Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Pelas indicações a candidata foi considerada:

**APROVADA**  
 **REPROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de julho de 2019.

Dr. Helton José dos Reis (UFMG)

Dr. Rafael Pinto Vieira (UFMG)

Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira - Coorientador (UFMG)

p/ Prof. Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por guiar meus passos e por todas as oportunidades de aperfeiçoamento concedidas. À minha mãe, e melhor amiga, Izabel por ser meu porto seguro e me apoiar incondicionalmente em todos os momentos. À meu pai Rafael pelo incentivo permanente aos estudos e pelo empenho e auxílio durante toda minha trajetória. À meu irmão e melhor amigo Rafael Júnior pela parceria, ajuda essencial e constante incentivo. À toda minha família pelo carinho e união fortalecedores e em especial aos meus lindos avós.

À Prof<sup>a</sup> Fabiola Ribeiro pela orientação paciente, incentivo e presença constantes, conselhos, e por todo encorajamento e confiança. Ao Prof<sup>o</sup> Antônio Carlos pela ajuda essencial durante o projeto mesmo antes da co-orientação. Ao Prof<sup>o</sup> João Marques por todos os conselhos e pelo aprendizado indispensável para minha formação. À Prof<sup>a</sup> Juliana Alves pelo auxílio constante, boa vontade e apoio que foram fundamentais. Ao Giovanni pela ajuda constante durante o projeto. À Ton por toda ajuda e companheirismo no lab. Aos queridos Jéssica, Pablo, Pri, Esther, Nath e Ana Luísa que contribuíram diretamente para o meu trabalho e auxiliaram minha caminhada. A todos os integrantes do RNAi muito obrigada por toda força, ajuda e por todas as risadas compartilhadas. Aos membros do Núcleo de Neurociências e dos laboratórios do Prof<sup>o</sup> Fabrício e Prof<sup>a</sup> Daniela pelo auxílio nos experimentos. À Ana T., Ana P., Karlinha e André por todo carinho, conselhos e apoio.

A todos os amigos da equipe do Giz pela imensurável contribuição para minha formação não somente profissional, mas também pessoal.

Às minhas amigas Alice, Carol, Gislaine, Isadora e Marcella por estarem sempre presentes, pela amizade que faz os dias mais leves e pelo auxílio nas horas em que mais precisei.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação o meu muito obrigada!

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a maior causa de demência. A etiologia da DA ainda não é completamente compreendida. A maioria dos casos tem origem desconhecida. Cada vez mais evidências demonstram a relevância de mecanismos imunológicos na patologia da DA. Dados recentes mostram que a perda sináptica observada desde estágios precoces da DA ocorre devido ao aumento da poda sináptica mediada por C1q e C3, proteínas do sistema complemento, que marcam sinapses para fagocitoses por micróglia. A quimiocina CX3CL1 possui um papel central na regulação da atividade destas células, havendo indícios de sua participação no processo de poda sináptica. A perda sináptica é o maior correlato com os déficits cognitivos encontrados na DA. Sabe-se que o peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), central na patologia da DA, interage com o receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5), alterando as vias de sinalização intracelular deste receptor e dando início as disfunções nas atividades sinápticas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel do mGluR5 na expressão de proteínas envolvidas na poda sináptica. Para isso, utilizamos camundongos machos e fêmeas WT e *knockout* de mGluR5 (mGluR5<sup>-/-</sup>) submetidos a injeção intracerebroventricular de  $A\beta_{1-42}$  ou PBS. Nossos resultados demonstraram que a injeção de  $A\beta_{1-42}$  e o mGluR5<sup>-/-</sup> não foram capazes de induzir um aumento no número de micróglia no hipocampo de camundongos macho, embora, aparentemente, a morfologia destas células apresente um perfil de ativação. A injeção de  $A\beta_{1-42}$  e o mGluR5<sup>-/-</sup> também não induziram alterações nos níveis de mRNA de C3 e CX3CL1 em camundongos machos. Em oposição, foi observada uma elevação nos níveis de mRNA de C3 no hipocampo de camundongos mGluR5<sup>-/-</sup> fêmeas injetadas com PBS. No nível proteico, nossos resultados demonstraram uma diminuição de CX3CL1 apenas no hipocampo de camundongos fêmeas mGluR5<sup>-/-</sup> injetadas com  $A\beta_{1-42}$  com relação às fêmeas WT injetadas com PBS. Mais experimentos são necessários para investigar os mecanismos inerentes a perda sináptica na DA, os quais parecem ser distintos em machos e fêmeas. O presente trabalho, enfatiza a importância da utilização de modelos de ambos os sexos nas pesquisas científicas, dada a considerável interferência de hormônios estrógenos e andrógenos nos mecanismos fisiológicos. A utilização de machos e fêmeas se faz ainda mais importante em contextos como o da DA, onde ainda são majoritários os estudos realizados em machos, apesar da incidência maior da DA em mulheres, prejudicando a extrapolação dos dados para a população humana.

**Palavras-chave:** doença de Alzheimer; mGluR5; sistema complemento; CX3CL1.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the major cause of dementia. The etiology of AD is not fully understood. The majority of the cases are of unknown origin. Increasing evidence demonstrates the relevance of immunological mechanisms in AD pathology. Recent data shows that the synaptic loss observed since early stages of AD is due to increased synaptic pruning mediated by C1q and C3, proteins of the complement system, which mark synapses for phagocytosis by microglia. The chemokine CX3CL1 plays a central role in the regulation of microglial activities and there are indications of its participation in the synaptic pruning process. Synaptic loss is the strongest correlate with the cognitive deficits found in AD. The amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ), central in the pathology of AD, interacts with the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5), altering its intracellular signalling pathways and initiating the dysfunctions in synaptic activities. Therefore, the aim of this work was to investigate the role of mGluR5 in the expression of proteins involved in the synaptic pruning. Thereunto, we used male and female WT and knockout mGluR5 (mGluR5<sup>-/-</sup>) mice submitted to intracerebroventricular injection of  $A\beta_{1-42}$  or PBS. Our results demonstrated that the injection of  $A\beta_{1-42}$  and the mGluR5<sup>-/-</sup> were not able to induce an increase in the microglia number in the hippocampus of male mice, although it appears that the morphology of these cells shows an activation profile. In addition, injection of  $A\beta_{1-42}$  and mGluR5<sup>-/-</sup> did not induce changes in the levels of C3 and CX3CL1 mRNAs in male mice. In contrast, it was observed an elevation of C3 mRNA levels in the hippocampus of female mGluR5<sup>-/-</sup> mice injected with PBS. At protein level, our results demonstrated a decrease in CX3CL1 only in the hippocampus of mGluR5<sup>-/-</sup> female mice injected with  $A\beta_{1-42}$  compared to female WT mice injected with PBS. More experiments are needed to investigate the mechanisms underlying synaptic loss in AD, which appear to be distinct in males and females. The present work emphasizes the importance of the use of models of both sexes in scientific research, given the considerable interference of estrogens and androgens in the physiological mechanisms. The use of males and females is even more important in contexts such as AD, where researches performed in males are still the majority, despite the higher AD incidence in females, which tarnishes the extrapolation of the data to the human population.

**Keywords:** Alzheimer's disease; mGluR5; complement system; CX3CL1.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Vias de ativação do sistema complemento. ....	19
<b>Tabela 1.</b> Iniciadores utilizados nas reações de qPCR. ....	27
<b>Figura 2.</b> Camundongos WT A $\beta$ , mGluR5 <sup>-/-</sup> e mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ apresentaram prejuízo na performance no teste de reconhecimento de objetos. ....	29
<b>Figura 3.</b> Camundongos WT A $\beta$ , mGluR5 <sup>-/-</sup> e mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ não apresentaram prejuízo na performance no paradigma de medo condicionado. ....	29
<b>Figura 4.</b> A injeção de A $\beta$ não alterou a atividade locomotora dos camundongos. ....	30
<b>Figura 5.</b> Não houve diferença no número de micróglia no hipocampo de camundongos WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5 <sup>-/-</sup> PBS e mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ em nenhuma das regiões analisadas. ....	32
<b>Figura 6.</b> Não houve diferença nos níveis de mRNA de C3 entre os machos WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5 <sup>-/-</sup> PBS e mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ . ....	33
<b>Figura 7.</b> Houve uma elevação nos níveis de mRNA de C3 em camundongos fêmea mGluR5 <sup>-/-</sup> PBS quando comparadas aos grupos WT PBS, WT A $\beta$ e mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ . ....	34
<b>Figura 8.</b> Não houve diferença nos níveis de mRNA de CX3CL1 no córtex, hipocampo ou cerebelo de machos WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5 <sup>-/-</sup> PBS e mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ . ....	35
<b>Figura 9.</b> Não houve diferença nos níveis de mRNA de CX3CL1 no córtex e hipocampo de fêmeas WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5 <sup>-/-</sup> PBS e mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ . ....	35
<b>Figura 10.</b> Houve uma aparente elevação nos níveis de CX3CL1 no hipocampo de machos mGluR5 <sup>-/-</sup> . ....	37
<b>Figura 11.</b> Houve uma redução na expressão de CX3CL1 em camundongos fêmea mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ quando comparado ao grupo WT PBS. ....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: Microgramas

µl: Microlitros

Aβ: Peptídeo β-amiloide

AMPA: Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropiónico

ACh: Acetilcolina

APP: Proteína precursora amilóide

ChAT: Colina acetiltransferase

C3: Componente 3 do sistema complemento

cDNA: DNA complementar

CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc

CX3CL1: C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1

C1q: Componente 1q do complemento

DA: Doença de Alzheimer

DAG: 1,2-diacilglicerol

DEPC: Dicarbonato de dietila

IBA-1: molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1

IP3: Inositol 1,4,5 trifosfato

LTD: Depressão de longa duração

LTP: Potenciação de longa duração

MAC: Complexo de ataque à membrana

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

MBL: Lectina ligante de manose

mGluR5: Receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5

mGluR5<sup>-/-</sup>: mGluR5 *knockout*

mM: Mili molar

mm: Milímetros

mRNA: RNA mensageiro

NAc: núcleo accumbens

nM: Nano molar

NMDA: N-metil- D-Aspartato

NO: Novo objeto

OA: Objetos antigos

PBS: Salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PLC: fosfolipase C

PKC: proteína quinase C

pmol: Picomol

qPCR: PCR quantitativo

REST: fator de transcrição que silencia o elemento repressor 1

RNA: Ácido ribonucleico

WT: *wild type*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Doença de Alzheimer .....	13
1.1.1 Modelos da doença de Alzheimer .....	15
1.2 O receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 .....	16
1.3 Poda sináptica.....	17
1.4 O sistema complemento.....	18
1.5 As micróglias e a sinalização CX3CL1-CX3CR1 .....	20
1.6 Perda sináptica complemento-dependente na doença de Alzheimer.....	20
2. OBJETIVOS .....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Materiais .....	23
3.2 Modelos animais.....	23
3.3 Peptídeo beta-amilóide <sub>1-42</sub> (A $\beta$ <sub>1-42</sub> ) .....	23
3.4 Cirurgia estereotáxica .....	24
3.5 Testes comportamentais.....	24
3.5.1 Campo aberto.....	24
3.5.2 Reconhecimento de objetos .....	24
3.5.3 Medo condicionado.....	25
3.6 Microdissecção em solução salina.....	25
3.7 Quantificação relativa de RNA .....	25
3.7.1 Transcrição reversa (RT).....	26
3.7.2 Desenho dos iniciadores .....	26
3.7.3 PCR quantitativo (qPCR) .....	26
3.8 Immunoblotting.....	27
3.9 Imunohistoquímica .....	27
3.10 Análise estatística .....	28
4. RESULTADOS .....	29
4.1 A injeção do peptídeo A $\beta$ e o <i>knockout</i> de mGluR5 prejudicou a performance dos animais no teste de reconhecimento de objetos, mas não no paradigma de medo condicionado .....	29
4.2 A injeção de A $\beta$ não alterou a atividade locomotora dos camundongos.....	30
4.3 O <i>knockout</i> de mGluR5 e a injeção de A $\beta$ não causaram elevação no número de micróglias das regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo .....	31

4.4. Os níveis de mRNA de C3 apresentaram elevação apenas no hipocampo de fêmeas mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	33
4.5. Não houve alteração nos níveis de mRNA de CX3CL1 em machos e fêmeas .....	34
4.6. Os níveis proteicos de CX3CL1 mostraram-se reduzidos no hipocampo de fêmeas mGluR5 <sup>-/-</sup> A $\beta$ . .....	36
5. DISCUSSÃO .....	39
6. CONCLUSÕES .....	44
7. PERSPECTIVAS .....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

A demência afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo inteiro. Com o envelhecimento populacional, este número pode chegar a 82 milhões em 2030 e a 152 milhões até 2050 (Freel *et al.*, 2018; Patterson, 2018). O custo global da demência é de cerca de um trilhão de dólares por ano, estimando-se que este será duas vezes maior até 2030 (Patterson, 2018). A doença de Alzheimer (DA) é a maior causa de demência, sendo responsável por 60 a 70% dos casos (Freel *et al.*, 2018).

### 1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é caracterizada por uma perda progressiva e incapacitante das funções neurológicas. Nas fases mais precoces da DA é possível observar um comprometimento leve da memória recente, ansiedade e dificuldade de concentração que podem ser confundidos com aspectos normais do processo de envelhecimento, dificultando o diagnóstico. Com a progressão da doença, os sintomas se agravam levando, em fases mais tardias, à perda severa de memória, impossibilidade de execução de tarefas cotidianas e dificuldades de locomoção, fala e deglutição (Reisberg; Franssen, 1999). A morte dos pacientes ocorre, usualmente entre seis e doze anos após o início dos sintomas em decorrência de complicações da imobilidade como embolia pulmonar e pneumonia (Brunton *et al.*, 2018).

As principais alterações observadas no cérebro de pacientes com a DA são atrofia cortical difusa, perdas sinápticas e neuronais e a presença de emaranhados neurofibrilares intraneuronais da proteína tau e de placas extracelulares formadas pelo peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ) (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; C.A. Davies, 1987; Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Os mecanismos etiológicos da DA ainda não são claros. Em torno de 6% dos casos tem origem em mutações genéticas dominantes, sendo geralmente de início mais precoce, antes dos 65 anos (Selkoe, 2001; Zhu *et al.*, 2015). Entretanto, a grande maioria dos casos tem origem idiopática, isto é, desconhecida. Contudo, algumas mutações gênicas estão relacionadas com uma maior propensão ao desenvolvimento da DA (Selkoe, 2001). O fator que mais correlaciona-se com o desenvolvimento da DA é a idade (Evans *et al.*, 1989; Lendon *et al.*, 1997). As hipóteses que visam dissecar a etiologia da DA são bastante diversas. Em sua maioria, envolvem alterações nas transmissões colinérgica e glutamatérgica e os efeitos neurotóxicos dos acúmulos de tau e A $\beta$  característicos da DA (Falco *et al.*, 2016).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor importante, envolvida em múltiplos processos cognitivos. Indivíduos com DA apresentam uma perda de neurônios colinérgicos e uma redução da concentração da colina acetiltransferase, responsável pela síntese de ACh, no córtex e no hipocampo. O prejuízo da transmissão colinérgica está associado à severidade do déficit cognitivo dos pacientes (Perry, 1980; Wilcock *et al.*, 1982). As drogas mais amplamente utilizadas para o tratamento sintomático da DA são os inibidores de colinesterase, sendo capazes de melhorar o desempenho cognitivo em grande parte dos casos. Estes compostos inibem a atividade de enzimas que realizam a hidrólise de ACh, as acetilcolinesterases. Desse modo, há um aumento na concentração de ACh na fenda sináptica. É importante ressaltar, que os efeitos dos inibidores de colinesterase são temporários, não afetando a progressão da doença (Raina *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008; Schachter; Davis, 1999).

Alterações na transmissão glutamatérgica também têm sido relacionadas à DA. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos, participando dos processos de aprendizagem e formação de memórias (Maragos *et al.*, 1987; Ribeiro *et al.*, 2017). Sua sinalização é mediada por receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) que são divididos em três grupos baseado na homologia de suas sequências e na sinalização via transdutores de sinais específicos. O grupo I inclui o mGluR1 e mGluR5, o grupo II o mGluR2 e mGluR3 e do grupo III fazem parte os mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (Pin; Duvoisin, 1995; Conn; Pin, 1997; Gerber *et al.*, 2007). Além dos receptores metabotrópicos, a sinalização de glutamato também ocorre por intermédio de receptores ionotrópicos, sendo eles de três tipos: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), N-metil- D-Aspartato (NMDA) e cainato. Muitos estudos destacam o papel da excitotoxicidade mediada por glutamato em patologias como a DA, onde esta atuaria na extensão e manutenção do processo neurodegenerativo. Nesse contexto patológico, os receptores de NMDA são ativados de modo excessivo, induzindo a via apoptótica. A liberação de glutamato ativa, inicialmente, receptores AMPA e cainato. A despolarização gerada por essa ativação levaria, então, à remoção do bloqueio dos receptores de NMDA exercido pelo  $Mg^{2+}$ , permitindo maior influxo de  $Ca^{2+}$  e  $Na^{+}$  no neurônio, aumentando sua excitabilidade e iniciando o processo de morte neuronal por excitotoxicidade (Greenamyre; Young, 1989; Sucher *et al.*, 1996; Dingledine *et al.*, 1999; Parsons *et al.*, 2007).

Grande parte dos estudos debruça-se sobre a hipótese amiloide. A presença de agregados de A $\beta$  é uma característica marcante da DA. Muito embora placas profusas de A $\beta$  possam ser encontradas em cérebros de pessoas que não possuem sintomas de demência, o

acúmulo de oligômeros de A $\beta$  é um fator característico de pacientes com DA (Lue *et al.*, 1999). O A $\beta$  é produzido a partir da clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Em condições normais a APP é clivada pela  $\alpha$ -secretase, dando origem a APP $\alpha$  solúvel com funções de protetoras neuronais (Shoji *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1993; Furukawa *et al.*, 1996). Em condições patológicas há um aumento acelerado da ocorrência de outra via de processamento da APP, onde esta é clivada pela  $\beta$ - secretase e pela  $\gamma$ - secretase, dando origem a fragmentos de diferentes tamanhos. Os mais abundantes são o A $\beta$ <sub>1-40</sub>, com 40 resíduos de aminoácidos e o A $\beta$ <sub>1-42</sub>, com 42 resíduos de aminoácidos (Yan; Wang, 2006). O A $\beta$ <sub>1-42</sub> é mais neurotóxico e mais propenso à agregação (Jarrett *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 2004).

Dentre as mutações que conhecidamente causam demência, estão as mutações na APP que aceleram a produção de A $\beta$ . Essas mutações, dão origem a DA de início precoce que recapitula todos os aspectos patofisiológicos da DA esporádica, incluindo os agregados neurofibrilares da proteína TAU (Small; Duff, 2008). TAU é uma proteína associada a microtúbulos que está envolvida no controle da estabilidade destas estruturas (Maccioni; Cambiasso, 1995). Sabe-se que seu acúmulo contribui para os eventos neurotóxicos observados na DA (Fasulo *et al.*, 2000; Rohn *et al.*, 2002; Stamer *et al.*, 2002). Em contrapartida às mutações na APP, mutações no gene que codifica TAU provocam sua hiperfosforilação e conseqüente agregação mas não levam ao desenvolvimento da DA, mas sim de outra forma de demência (Hutton *et al.*, 1998; Small; Duff, 2008). Esses achados reforçam a hipótese amiloide, que considera o acúmulo de A $\beta$  como o agente gerador da DA (Tanzi; Bertram, 2005).

Os mecanismos pelos quais a toxicidade do A $\beta$  é exercida ainda não são completamente compreendidos, embora tenha sido demonstrado que estes mecanismos envolvem a ativação microglial e expressão de genes pro-inflamatórios (Roth *et al.*, 2005; Glass *et al.*, 2010), prejuízo ao transporte axonal (Hiruma *et al.*, 2003; Rui *et al.*, 2006; Pigino *et al.*, 2009; Decker *et al.*, 2010), indução de estresse oxidativo (Mark *et al.*, 1996; Varadarajan *et al.*, 2000; Lin; Beal, 2006; Guglielmotto *et al.*, 2010) e ativação de caspases (Troy *et al.*, 2000).

### 1.1.1 Modelos da doença de Alzheimer

Dois tipos de modelos são mais usualmente empregados no estudo da DA os modelos transgênicos e os induzidos pela injeção de A $\beta$ . Os modelos transgênicos exibem alterações genéticas associadas a DA de origem hereditária, não apresentando todas as características

encontradas na DA de origem esporádica, que compreende a maioria dos casos em humanos (Laferla; Green, 2012). Estes modelos manifestam um desenvolvimento gradual, isto é, idade dependente da patologia, assim como ocorre nos pacientes com DA, contudo, não apresentam a perda neuronal encontrada em humanos (Ribeiro *et al.*, 2013).

Os modelos induzidos pela injeção de A $\beta$  são uma alternativa para o estudo da DA, visto que este peptídeo está fortemente envolvido com a patologia da doença. A injeção de A $\beta$  é eficiente na indução de déficit de memória e alterações semelhantes às aquelas encontradas em pacientes com DA. Este modelo tem como vantagem a administração de quantidades controladas do peptídeo, além da rapidez no desenvolvimento das alterações patológicas em contraste com os modelos transgênicos. No entanto, por serem modelos mais agudos não refletem a evolução progressiva da doença, além de serem administradas quantidades de A $\beta$  muito superiores às presentes nos cérebros de indivíduos acometidos com a DA (Ribeiro *et al.*, 2013).

## 1.2 O receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5

Um outro mecanismo proposto para a neurotoxicidade do A $\beta$  envolve sua interação com as extremidades sinápticas, alterando sua morfologia e função. Desta interação participa o receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5) (Renner *et al.*, 2010). O mGluR5 é amplamente expresso no sistema nervoso central, tanto em neurônios, quanto em células da glia (Balazs *et al.*, 1997), sendo mais expresso no hipocampo, córtex, bulbo olfatório e corpo estriado (Kerner *et al.*, 1997). O mGluR5 é acoplado a proteína G $\alpha_q/11$  que ativa a fosfolipase C (PLC). A fosfolipase C, por sua vez, provoca a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), formando 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>). Há então uma liberação de Ca<sup>2+</sup> das reservas intracelulares provocada pela ligação do IP<sub>3</sub> aos receptores do retículo endoplasmático. A ativação da proteína quinase C (PKC) é então provocada pela ligação cooperativa do DAG e do Ca<sup>2+</sup>. A PKC é capaz de ativar proteínas como a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), importante para a regulação celular e para a plasticidade sináptica e formação de memórias (revisado por Willard; Koochekpour, 2013)

O mGluR5 tem sido frequentemente implicado na etiologia da DA, sobretudo por funcionar como co-receptor na interação do A $\beta$  com as extremidades sinápticas (Um *et al.*, 2013). Renner *et al.* (2010) demonstraram que o A $\beta$  é capaz de alterar a localização do mGluR5 em neurônios. O equilíbrio no número de receptores sinápticos é essencial para o correto funcionamento das sinapses (Ehlers *et al.*, 2007). Os receptores possuem a capacidade

de difundir-se para regiões sinápticas e extra sinápticas, sendo estabilizados de forma transiente na membrana (Triller; Choquet, 2008). A interação do A $\beta$  com as extremidades sinápticas reduz a capacidade de difusão lateral do mGluR5, provocando uma aglomeração aberrante deste receptor, induzindo uma elevação na concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> e uma redução de NMDARs localizados nas sinapses (Renner *et al.*, 2010).

Posteriormente, outros trabalhos foram capazes de melhor elucidar o papel do mGluR5 na interação do A $\beta$  com as extremidades sinápticas. O A $\beta$  liga-se com alta afinidade à proteína príon celular (PrP<sup>C</sup>). O complexo A $\beta$ -PrP<sup>C</sup> interage com mGluR5, que medeia a ativação da quinase Fyn que, por sua vez, fosforila a subunidade NR2B dos NMDARs, culminando em um aumento breve do número de NMDARs na superfície, o que induz uma excitotoxicidade inicial mediada por Ca<sup>2+</sup> (Lauren *et al.*, 2009; Um *et al.*, 2012; Um *et al.*, 2013). Segue-se, então, uma supressão desta fosforilação com conseqüente redução da concentração de Ca<sup>2+</sup> e redução de NMDARs nas sinapses que pode estar relacionada à capacidade do A $\beta$  de inibir a potenciação de longa duração (LTP) demonstrada em inúmeros trabalhos (Walsh *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Snyder *et al.*, 2005; Yamin, 2009; Um *et al.*, 2012). Estas alterações nas vias intracelulares de sinalização são implicadas na disfunção e posterior perda sináptica observadas na doença de Alzheimer (Walsh *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Snyder *et al.*, 2005; Yamin, 2009; Um *et al.*, 2012; Um *et al.*, 2013).

### 1.3 Poda sináptica

A perda sináptica é o maior correlato com os déficits cognitivos encontrados na DA (Dekosky; Scheff, 1990; Terry *et al.*, 1991), mostrando-se mais expressiva no hipocampo, córtex frontal e córtex temporal (Honer, 2003). Segundo Hong *et al.* (2016), a perda sináptica observada desde os estágios iniciais da DA se deve ao aumento de uma via de poda sináptica que normalmente é menos ativa no cérebro adulto. A poda sináptica ocorre em maior taxa durante o desenvolvimento, sendo importante para o refinamento das conexões neuronais e correto funcionamento das redes neurais (Kantor; Kolodkin, 2003). Neste processo, conexões sinápticas mais fortes são mantidas e conexões pouco utilizadas são eliminadas (Katz; Shatz, 1996; Sanes; Lichtman, 1999; Hua; Smith, 2004). Portanto, a eliminação de sinapses é dependente de atividade. Enquanto a LTP promove a estabilização de sinapses, a depressão de longa duração induz sua retração e eliminação (Zhou *et al.*, 2004; Bastrikova *et al.*, 2008; De Roo *et al.*, 2008).

Os mecanismos pelos quais a poda sináptica ocorre ainda não foram completamente esclarecidos. Moléculas do sistema imune têm sido frequentemente apontadas como mediadoras desse processo. O envolvimento do sistema do complemento na poda sináptica foi demonstrado primeiramente no núcleo geniculado lateral onde o componente 1q do complemento (C1q) e o componente 3 do complemento (C3) foram encontrados em proximidade com sinapses imaturas, havendo um prejuízo da eliminação sináptica em animais *knockout* para estas moléculas (Stevens *et al.*, 2007). Mais tarde, verificou-se que durante o processo de desenvolvimento C1q e C3 marcam as sinapses para fagocitose por micróglia de maneira dependente de atividade (Schafer *et al.*, 2012).

No contexto patológico da DA constatou-se que a presença do complexo de ataque a membrana (MAC) apresenta maior relação com a perda sináptica do que com a presença de emaranhados neurofibrilares e a deposição de A $\beta$  (Lue *et al.*, 1996). Adicionalmente, há uma elevação dos níveis de C1q e C3 em modelos da DA, sendo esta superior ao aumento relacionado a idade. Por outro lado, a deleção de C1q e C3 em modelos da DA foi capaz de reduzir a neurodegeneração e a ativação microglial e aumentar a expressão de marcadores sinápticos (Fonseca *et al.*, 2004; Reichwald *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2017). Estes trabalhos indicavam, então, o envolvimento do sistema complemento também na perda sináptica observada na DA.

#### 1.4 O sistema complemento

O sistema complemento é conhecido pelas funções que desempenha como mediador do sistema imune inato e por ser um dos efetores da imunidade mediada por anticorpos. A cascata do complemento está envolvida especialmente na remoção fagocítica de patógenos, células apoptóticas e debris celulares (revisado por Fujita, 2002; Stephan *et al.*, 2012). É um sistema formado por múltiplas proteínas associadas à membrana ou circulantes que se encontram em forma de zimógenos (inativas) até sua interação com membranas ou superfícies biológicas. A partir desta interação são iniciadas mudanças estruturais, clivagens proteolíticas e formação de complexos enzimáticos ativos (convertases) que ativam outros substratos em uma reação em cascata (revisado por Fujita, 2002; Stephan *et al.*, 2012).

Há três vias de ativação do sistema complemento: a via clássica, a via alternativa e a via da lectina. Cada qual possui um fator iniciador da cascata e todas convergem para a ativação do C3 que dirige as funções efetoras, sendo um componente central de todas as vias conforme ilustrado na figura 1 (revisado por Fujita, 2002; Stephan *et al.*, 2012). A via clássica



é ativada pela ligação da lectina ligante de manose (MBL) a manose presente em membranas celulares e a via alternativa inicia-se com espontaneamente pela hidrólise de C3. Todas as vias culminam na hidrólise deste componente do complemento que dirige as funções efetoras, sendo elas a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) ou a fagocitose das estruturas alvo por células que expressem o receptor de C3 (CR3). (Stephan *et al.*, 2012)

### 1.5 As micróglia e a sinalização CX3CL1-CX3CR1

As micróglia são as células imunocompetentes do sistema nervoso central (SNC), compondo o sistema de defesa inato do SNC e possuindo ação semelhante à de macrófagos. No cérebro sadio as micróglia estão constantemente inspecionando o SNC através da constante retração e projeção de processos celulares (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005; Kettenmann *et al.*, 2013). Eventos patológicos provocam sua ativação, induzindo a adoção de um perfil amebóide com a produção de espécies reativas de oxigênio e de diversos mediadores imunes (Kettenmann *et al.*, 2013). Esta considerável influência no desenvolvimento das diferentes patologias que acometem o SNC torna essencial o estudo dos mecanismos de controle de sua atividade. Um dos principais reguladores da atividade microglial é a fractalkina ou neurotactina (CX3CL1) que está implicada no controle da neurotoxicidade destas células (Cardona *et al.*, 2006).

A CX3CL1 é sintetizada como uma glicoproteína transmembrana, podendo ser clivada liberando um domínio de quimiocina solúvel (Bazan *et al.*, 1997). A CX3CL1 é expressa majoritariamente em neurônios, embora astrócitos possam apresentá-la em menores níveis (Hatori *et al.*, 2002). O receptor de CX3CL1, o CX3CR1, é predominantemente expresso em micróglia (Hatori *et al.*, 2002). Desse modo, a CX3CL1 produzida por neurônios pode induzir efeitos nas micróglia que podem, em contrapartida, produzir imunomoduladores que agirão nestes neurônios e em outros que estejam próximos (Sheridan; Murphy, 2013). O *knockout* de CX3CR1 em camundongos prejudica a eliminação sináptica no hipocampo, o que sugere a participação da sinalização CX3CL1-CX3CR1 nos mecanismos de poda sináptica (Paolicelli *et al.*, 2011). Seu papel na DA ainda não foi esclarecido, havendo resultados contraditórios (Prokop *et al.*, 2013).

### 1.6 Perda sináptica complemento-dependente na doença de Alzheimer

O envolvimento do sistema complemento e das micróglia na patologia da DA já havia sido demonstrado em diferentes estudos. No entanto, sua participação era vista como uma consequência da neuroinflamação que se apresentava em estágios posteriores (Stephan *et*

*al.*, 2012). O trabalho conduzido por Hong *et al.* (2016) foi o primeiro a mostrar o papel detrimental das micróglia e do sistema complemento na perda sináptica observada nos estágios iniciais da DA. Neste trabalho, observou-se um aumento da deposição de C1q e C3 nas sinapses do córtex e hipocampo de camundongos transgênicos para a APP humana (hAPP). Esta deposição induziu a fagocitose de sinapses por micróglia, sendo esta independente da deposição de placas de A $\beta$ . A injeção de oligômeros de A $\beta$  também foi capaz de causar esta perda sináptica mediada pelo sistema complemento, corroborando o papel central da forma solúvel deste peptídeo na DA. Com a inibição de C1q, C3 e CR3, a perda sináptica e o número de micróglia fagocíticas foi reduzido. Outros trabalhos realizados em modelos distintos da DA deram suporte a estes achados (Shi *et al.*, 2017; Dejanovic *et al.*, 2018).

Tendo em vista que o A $\beta$  interage com mGluR5, iniciando as disfunções das atividades sinápticas, e que este peptídeo é capaz de induzir a expressão de elementos do sistema complemento e a fagocitose de sinapses por micróglia, torna-se imperativa a análise da participação do mGluR5 nos mecanismos da perda-sináptica complemento-dependente e na regulação da atividade das células fagocíticas envolvidas neste processo, que é realizada em grande parte por CX3CL1.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do *knockout* de mGluR5 na expressão de C3 e CX3CL1 em camundongos submetidos a injeção intracerebroventricular de A $\beta$ , bem como analisar o papel desse receptor no déficit cognitivo e na ativação microglial provocada por este peptídeo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar se a injeção de A $\beta$  em machos WT e mGluR5 *knockout* foi capaz de induzir déficit cognitivo;
- Verificar se a injeção de A $\beta$  em machos WT e mGluR5 *knockout* induziu microgliose através de experimentos de imunohistoquímica, utilizando o anticorpo anti Iba-1;
- Analisar a expressão de C3 e CX3CL1 em machos e fêmeas WT e mGluR5 *knockout* injetados com A $\beta$  ou PBS através de PCR quantitativo em tempo real e western blot.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

2-propanol, solução de Betaína, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, NaCl, paraformaldeído, proteinase K, solução Tris (hidroximetil) aminometano-hidroclorídrico (Tris HCl) e solução tris (hidroximetil) aminometano - ácido etilenodiamino tetra-acético (Tris-EDTA) foram adquiridos da Sigma Aldrich®. Tubos tipo eppendorff e ponteiros de micropipetas foram adquiridos da Axygen Brasil. (dNTPs) foram adquiridos da Thermo Scientific®. H<sub>2</sub>O Nucleasefree foi adquirida da Ambion®. Os iniciadores utilizados para as reações de PCR e qPCR estão devidamente descritos na tabela 1 e foram adquiridos da Síntese Biotecnologia. O kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, bem como o SYBR® Safe foram adquiridos pela Thermo Scientific®. Lamínulas de 12mm e lâminas foram adquiridas pela Pró cito Laboratórios. Os kits Vectastain Elite ABC (Mouse e Rabbit IgG) e Vector SG Peroxidase Substrate foram adquiridos da Vector Laboratories. O anticorpo anti-IBA-1 é da marca WAKO e o anticorpo anti CX3CL1 foi adquirido da empresa R&D Systems.

#### 3.2 Modelos animais

Foram utilizados como modelos experimentais camundongos machos (12 a 15 meses) e fêmeas (12 a 16 meses) C57/B6 *wild type* e mGluR5 *knockout* C57/B6;129-Grm5tm1Rod/J (mGluR5<sup>-/-</sup>) submetidos a injeção estereotáxica intracerebroventricular (ICV) de beta-amilóide<sub>1-42</sub> (A $\beta$ <sub>1-42</sub> - Thermo Scientific) ou PBS. Os animais foram criados e mantidos em biotério próprio com fornecimento de água e ração *ad libitum* e em condições controladas de temperatura (23°C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12h). Os procedimentos experimentais contidos neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo n° 300/2017.

#### 3.3 Peptídeo beta-amilóide<sub>1-42</sub> (A $\beta$ <sub>1-42</sub>)

Foram utilizadas alíquotas de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Thermo Scientific). A reconstituição e indução da agregação do peptídeo foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Foram administrados 400 pmol de A $\beta$ <sub>1-42</sub> em um volume total de 1 $\mu$ l (adaptado de Bellozi *et al.*, 2016).

### 3.4 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados através da administração de Isoflurano 100% (Cristália). A analgesia foi realizada através da aplicação intramuscular de 0,05 mg/kg de cloridrato de tramadol (Tramadon® Cristália) antes do início da cirurgia. Após a anestesia, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico. O bregma e o lambda foram alinhados nos planos vertical e horizontal. Utilizou-se as coordenadas estereotáxicas para injeção no ventrículo lateral direito (latero-lateral: -1 mm; antero-posterior: - 0,22 mm; dorso-ventral: - 2,5 mm) (George Paxinos, 2001). Foram administrados 1 µl de Aβ<sub>1-42</sub> ou veículo (PBS) à uma taxa de infusão de 0,5 µl/minuto. A injeção foi controlada através da utilização de uma bomba de microinfusão acoplada a uma seringa de 10 µl (Hamilton). Para evitar o refluxo das soluções administradas a agulha foi removida dois minutos após o término da infusão (Lazaroni *et al.*, 2012). O tempo de recuperação pós-cirúrgico para o início dos testes comportamentais foi de quatro dias.

### 3.5 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram iniciados no 4º dia após a injeção dos camundongos machos. Os animais foram habituados na sala de experimentos comportamentais por pelo menos 30 minutos antes do início de cada um dos testes.

#### 3.5.1 Campo aberto

Foi utilizado um aparato automático de campo aberto para avaliação da atividade locomotora espontânea dos animais (LE 8811 IR Monitores de Atividade Motora PANLAB/HARVARD APPARATUS) com dimensões de 450 x 450 x 200 mm (largura x profundidade x altura) (Pereira *et al.*, 2014). Cada animal foi colocado individualmente no centro do aparato e o registro das atividades locomotoras foi realizado pelo programa ACTITRACK (Guimaraes *et al.*, 2015) durante 60 minutos.

#### 3.5.2 Reconhecimento de objetos

Para avaliação da memória de longo prazo (Bellozi *et al.*, 2016) foi utilizado o reconhecimento de novo objeto. No 4º dia após a injeção foi permitida a livre exploração do aparato pelos animais, sem os objetos, por 5 minutos. No 5º e 6º dias, os animais foram colocados no aparato com a introdução de dois objetos idênticos posicionados diagonalmente,

sendo permitida a livre exploração desses objetos por 10 e 5 minutos respectivamente. No 7º dia, um dos objetos antigos (OA) foi substituído por um novo objeto (NO), sendo os animais reintroduzidos no aparato e permitida a livre exploração por 10 minutos (Adaptado de Bellozi *et al.*, 2016). O tempo de exploração de cada um dos objetos foi contabilizado e utilizado para avaliação da memória. O índice de reconhecimento foi obtido através da fórmula tempo NO x 100/ tempo NO + tempo OA. Um índice maior do que 50% indica que não há déficit cognitivo. Os animais que tiveram tempo de exploração total menor do que 10 segundos foram excluídos da análise.

### 3.5.3 Medo condicionado

No 7º dia depois da injeção, após o teste de reconhecimento de objetos, os animais foram habituados por 3 minutos em um aparato de medo condicionado com dimensões de 230 x 200 x 210 mm (comprimento x profundidade x altura) com fundo gradeado. Após a habituação, foram aplicados três choques de 0,6 mA e duração de 2s com intervalos de 30, 60 e 40 segundos. Aguardou-se um intervalo de 1 minuto após o último choque para a retirada dos animais do aparato. No 8º dia os animais foram reintroduzidos no aparato e o tempo de *freezing* foi contabilizado por 5 minutos (adaptado de Roy *et al.*, 2016).

### 3.6 Microdissecção em solução salina

Os machos C57/B6 *wild type* injetados com PBS (WT PBS) ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> (WT A $\beta$ ) e mGluR5<sup>-/-</sup> injetados com PBS (mGluR5<sup>-/-</sup> PBS) ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> (mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$ ) foram eutanasiados após os experimentos comportamentais, no 8º dia após a injeção. Foram dissecados o hipocampo, córtex e cerebelo de um dos hemisférios cerebrais para realização de RT-qPCR e *immunoblotting* e o outro hemisfério foi destinado à realização de imunohistoquímica. Já as fêmeas WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> PBS e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  foram eutanasiadas no 3º dia após a injeção, sendo um hemisfério cerebral destinado a RT-qPCR e o outro hemisfério utilizado para os experimentos de *immunoblotting*.

### 3.7 Quantificação relativa de RNA

Após a dissecção das regiões de interesse, o RNA total foi extraído pelo método TRIzol® (Invitrogen™) segundo instruções do fabricante. O RNA foi ressuspenso em 20  $\mu$ l (hipocampo), 30  $\mu$ l (cerebelo) ou 50  $\mu$ l (córtex) de água livre de nucleases DEPC e armazenado a -80º C.

### 3.7.1 Transcrição reversa (RT)

A concentração e qualidade do RNA foram analisadas por espectrofotômetro (Multiskan Go – Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 µg de RNA para um volume final de 20 µl de reação de transcrição reversa.

### 3.7.2 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores (tabela 1) para a quantificação dos níveis de mRNA dos gene alvo foram desenhados com o auxílio do software Primer3plus (Untergasser *et al.*, 2007). A especificidade dos iniciadores foi verificada através da ferramenta Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

### 3.7.3 PCR quantitativo (qPCR)

A expressão gênica foi analisada através de PCR quantitativo ou *Real Time PCR*. Para a análise da expressão de C3 foi utilizado o kit Power SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied ® Biosystems), conforme o protocolo do fabricante. As reações de qPCR para o gene CX3CL1 foram realizadas com o kit SYBR® GREEN (Applied ® Biosystems), sendo utilizado um mix com 1 µl de tampão da enzima 10X (100 mM Tris pH 8,3; 500 mM KCl; 0,1% Triton x100), 4 µl de cDNA, 0,25 µl de dNTP 10 mM, 0,1 µl de fluoróforo SYBR® GREEN (Applied ® Biosystems), 0,6 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,08 µl do iniciador 50 nM, 2 U da enzima Taq e água livre de nucleases (Ambion®) para um volume total de 10 µl. Todas as reações foram feitas utilizando-se as plataformas StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems e QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System. As amostras foram preparadas em triplicatas, sendo as variações de expressão dos genes alvo calculadas através do método  $2^{-\Delta Ct}$ . Os níveis de mRNA de actina-β foram utilizados como normalizador. Os valores de *baseline* e *threshold* foram ajustados de acordo com cada iniciador. A eficiência dos iniciadores foi testada através de diluições seriadas.

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados nas reações de qPCR.

<b>Código</b>	<b>Sequência</b>	<b>Amplicom (pb)</b>	<b>TM (°C)</b>	<b>% GC</b>	<b>N° Identificador</b>
<b>Mm-C3-F</b>	AAGCATCAACACACCCAACA	172	60	45	NM_009778.3
<b>Mm-C3-R</b>	CTTGAGCTCCATTCGTGACA		60	50	
<b>Mm-Cx3Cl1. F</b>	CGACAAGATGACCTCACGAA	100	59,8	50	NM_009142.3
<b>Mm-Cx3Cl1. R</b>	CTGTGTCGTCTCCAGGACAA		59,9	55	
<b>Actina - R</b>	AATGCCTGGGTACATGGTGGTA	122	58,4	50	NM_007393.3
<b>Actina - F</b>	TGGAATCCTGTGGCATCCATGA		58,6	50	

### 3.8 Immunoblotting

O córtex e hipocampo dos camundongos WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> PBS e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  foram armazenados em um tampão de lise (1% Triton X-100; 100 mM Tris/HCl, pH 8.0; 10% glycerol; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 25 mM NaF; 2.5  $\mu$ g/ml leupeptina; 5  $\mu$ g/ml aprotinina; and 1 mM ortovanadato de sódio) a -80° C. As amostras foram maceradas e a concentração de proteínas determinada através do ensaio de Bradford (Bio-Rad). 100  $\mu$ g das amostras de proteína foram separadas em gel SDS-PAGE de 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas e incubadas com anticorpo primário contra actina (1:5000) e CX3CL1 (1:500) a 4° C *overnight*. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS tween 0,1% (TBST) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado (1:2500) por 1h à temperatura ambiente. Após a incubação e lavagem com TBST, foi utilizado o Kit ECL plus (GE Healthcare) e o sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Technologies) para detecção das proteínas por quimioluminescência. A densidade das bandas foi quantificada com a utilização do software ImageJ (NIH, USA). A expressão de CX3CL1 foi normalizada pelos níveis de  $\beta$ -actina de cada amostra. Posteriormente, calculou-se a porcentagem de cada grupo com relação à porcentagem do grupo controle (WT PBS) que foi definida como 100%.

### 3.9 Imunohistoquímica

Os machos WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> PBS e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) and xilazina (8 mg/kg) via intraperitoneal e submetidos a toracotomia para exposição do coração. Uma agulha hipodérmica foi inserida no ventrículo esquerdo para administração de PBS com o auxílio de uma bomba peristáltica (4 mL/min). Foi feita uma

incisão no arco aórtico para permitir a saída do sangue. Após a perfusão, os animais foram submetidos a craniotomia e um dos hemisférios cerebrais foi armazenado em PFA 4% por 72h. Posteriormente, as amostras foram transferidas para tubos contendo solução de sacarose 30% em PBS e armazenadas a 4°C. Os hemisférios cerebrais foram congelados com isopentano 99% em gelo seco. Foram feitas fatias de 30  $\mu\text{m}$  a -20° com o auxílio de um criostato. As fatias foram armazenadas em freezer em solução crioprotetora. Por meio de fatias *free-floating*, foi utilizado o protocolo de detecção através da enzima peroxidase. A atividade da peroxidase foi extinguida com 0,3% de peróxido de hidrogênio. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS 1X por 2 x durante 5 minutos, seguido de permeabilização com Triton (X-100) 1% por 10 minutos. O bloqueio de ligações não específicas foi feito utilizando 1,5% de soro de cabra (Vector Elite Kit) por 30 minutos, seguido de incubação com o anticorpo anti-IBA-1 (1:500) em PBS contendo 2% de soro de cabra e 3% de BSA por 90 min a 4°C. Em seguida, as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho (1:1000) conjugado com a biotina (Vector Elite Kit) por 90 min a 4°C. As fatias foram, então, incubadas com uma solução contendo a enzima peroxidase complexada a avidina (Vector Elite Kit) por 90 min a 4° C. A imunomarcagem foi visualizada utilizando o substrato da enzima peroxidase e o cromógeno (Vector Elite Kit). As fatias foram montadas em lâminas e visualizadas utilizando o Axio Imager A2-Carl Zeiss Microscope com lente Zeiss de 20x. Uma área representativa de 710x532  $\mu\text{m}$  das imagens das regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo foi analisada, utilizando-se três fotos/região/animal. O número de células foi contado utilizando a ferramenta *cell counter* do software ImageJ (NIH, USA).

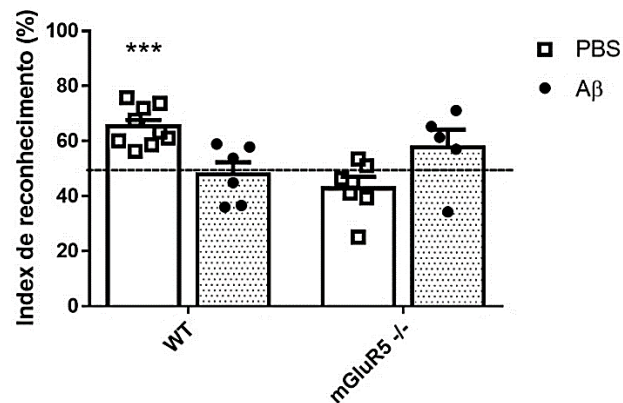
### 3.10 Análise estatística

A análise estatística foi feita como auxílio do software GraphPad Prism versão 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Com exceção do experimento de reconhecimento de objetos, os dados foram analisados pelo teste de análise de variância two-way ANOVA. Foi utilizado o pós-teste de Tukey para comparações entre as médias de todos os grupos analisados. Para o reconhecimento de objetos foi utilizado o teste t *one-sample*, onde compara-se as médias dos grupos à um valor fictício pré-definido (50%). Os testes que obtiveram valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

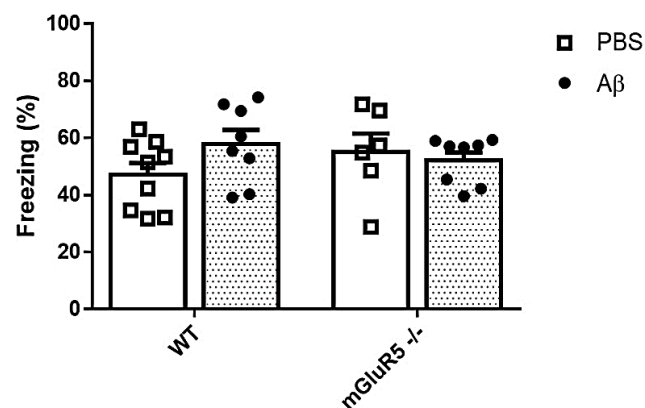
## 4. RESULTADOS

### 4.1 A injeção do peptídeo A $\beta$ e o *knockout* de mGluR5 prejudicou a performance dos animais no teste de reconhecimento de objetos, mas não no paradigma de medo condicionado

Para verificar se a injeção ICV do peptídeo A $\beta$  foi capaz de induzir déficits cognitivos nos camundongos machos, estes foram submetidos ao teste de reconhecimento de novo objeto e de medo condicionado ao contexto para avaliação da memória de longo prazo (Roy *et al.*, 2016)



**Figura 2.** Camundongos WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  apresentaram prejuízo na performance no teste de reconhecimento de objetos. Os gráficos mostram a performance de machos de 12 a 15 meses WT PBS (n=9), WT A $\beta$  (n=6), mGluR5<sup>-/-</sup> PBS (n=6) e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  (n=5) no teste de reconhecimento de novo objeto. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \*\*\* representa  $p < 0,001$  no teste t *one-sample*.



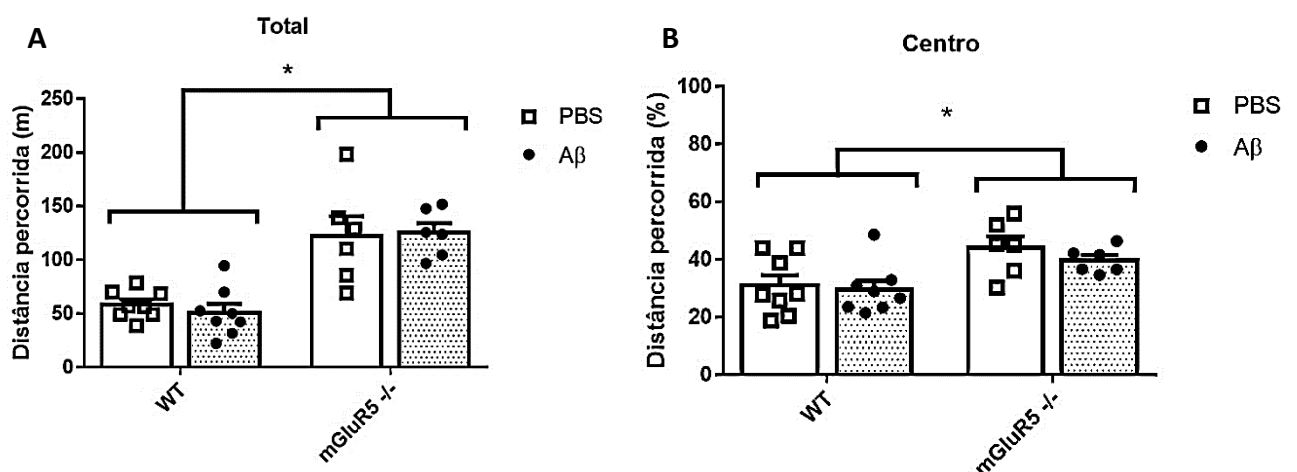
**Figura 3.** Camundongos WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  não apresentaram prejuízo na performance no paradigma de medo condicionado. Os gráficos mostram a performance de machos de 12 a 15 meses WT PBS (n=9), WT A $\beta$  (n=8), mGluR5<sup>-/-</sup> PBS (n=6) e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  (n=8) no paradigma de medo condicionado. Os dados representam a média  $\pm$  SEM.

Os dados mostram que os camundongos WT PBS apresentaram um index de reconhecimento significativamente superior a 50%, indicando conservação da memória. Isso não foi observado nos outros grupos, mostrando que tanto a injeção de A $\beta$  quanto o *knockout* de mGluR5 induziram déficit cognitivo nos animais (figura 2).

No caso do medo condicionado ao contexto, não houve diferença significativa na porcentagem de *freezing* entre os grupos analisados, demonstrando a preservação da memória de medo. Possivelmente, o estímulo aversivo utilizado neste experimento foi elevado, fazendo com que mesmo os animais que supostamente apresentam memória prejudicada fossem capazes de se lembrar do contexto em que o estímulo aversivo foi apresentado (figura 3).

#### 4.2 A injeção de A $\beta$ não alterou a atividade locomotora dos camundongos

O papel do mGluR5 nas atividades locomotoras é muito bem estabelecido. Sabe-se que o *knockout* deste receptor é capaz de induzir hiperlocomoção e tem um efeito ansiolítico (Kinney *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2014). A hiperlocomoção é verificada por uma maior distância total percorrida, enquanto o efeito ansiolítico pode ser visto em decorrência de o animal percorrer uma maior porcentagem desta distância no centro do aparato de campo aberto (Kinney *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2014). Para verificar o efeito da ablação do mGluR5 e da injeção de peptídeo A $\beta$ , camundongos foram colocados em um aparato de campo aberto para avaliação da atividade locomotora espontânea.



**Figura 4. A injeção de A $\beta$  não alterou a atividade locomotora dos camundongos.** Os gráficos mostram a performance de machos de 12 a 15 meses WT PBS (n=8), WT A $\beta$  (n=8), mGluR5<sup>-/-</sup> PBS (n=6) e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  (n=6) no teste de campo aberto que avaliou a atividade locomotora espontânea por 60 minutos. Os dados

representam a média  $\pm$  SEM da distância total percorrida (**A**) e da porcentagem da distância que foi percorrida no centro do aparato (**B**). \* representa  $p < 0,05$  no teste *two way* ANOVA.

Como esperado, os camundongos  $mGluR5^{-/-}$  apresentaram maior distância total percorrida (figura 4A), bem como maior porcentagem de distância percorrida no centro do aparato de campo aberto (figura 4B). A injeção do peptídeo  $A\beta$  não induziu alterações na atividade locomotora em nenhum dos grupos analisados.

#### 4.3 O *knockout* de $mGluR5$ e a injeção de $A\beta$ não causaram elevação no número de micróglia das regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo

A neuroinflamação crônica está incluída dentre os sinais patológicos da doença de Alzheimer, envolvendo a ativação de astrócitos e micróglia (Cameron; Landreth, 2010; Prokop *et al.*, 2013; Heneka *et al.*, 2015). A ativação de micróglia apresenta correlação com o acúmulo de peptídeo  $A\beta$  no tecido cerebral e com a progressão da DA (Dani *et al.*, 2018; Hamelin *et al.*, 2018). Uma das características da neuroinflamação presente na DA é o aumento no número de micróglia (Fuhrmann *et al.*, 2010; Prokop *et al.*, 2013; Bellozi *et al.*, 2016). Para verificar se havia alteração no número de micróglia em camundongos WT PBS, WT  $A\beta$ ,  $mGluR5^{-/-}$  PBS e  $mGluR5^{-/-}$   $A\beta$  foi realizada a técnica de imunohistoquímica em cortes coronais de hipocampo marcados com anticorpo anti-Iba1, um marcador específico daquelas células.

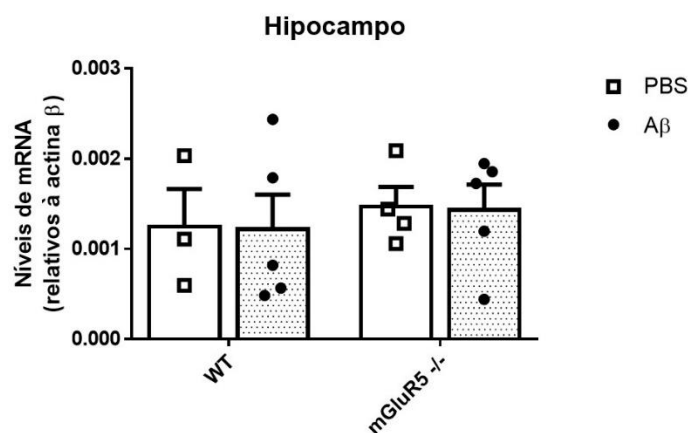
Não foram observadas diferenças entre os grupos analisados no número de micróglia na região CA1 (figuras 5A e 5E), CA2 (figura 5B e 5E) e CA3 (figura 5C e 5E) do hipocampo e nem na soma do número total de células das regiões analisadas (figura 5D). No entanto, nota-se visualmente diferença na morfologia das micróglia entre o grupo WT PBS e os grupos WT  $A\beta$ ,  $mGluR5^{-/-}$  PBS e  $mGluR5^{-/-}$   $A\beta$ . As micróglia dos grupos WT  $A\beta$ ,  $mGluR5^{-/-}$  PBS e  $mGluR5^{-/-}$   $A\beta$  aparentam possuir corpo celular maior e menos ramificações, sendo estes indícios de ativação destas células (figura 5E).



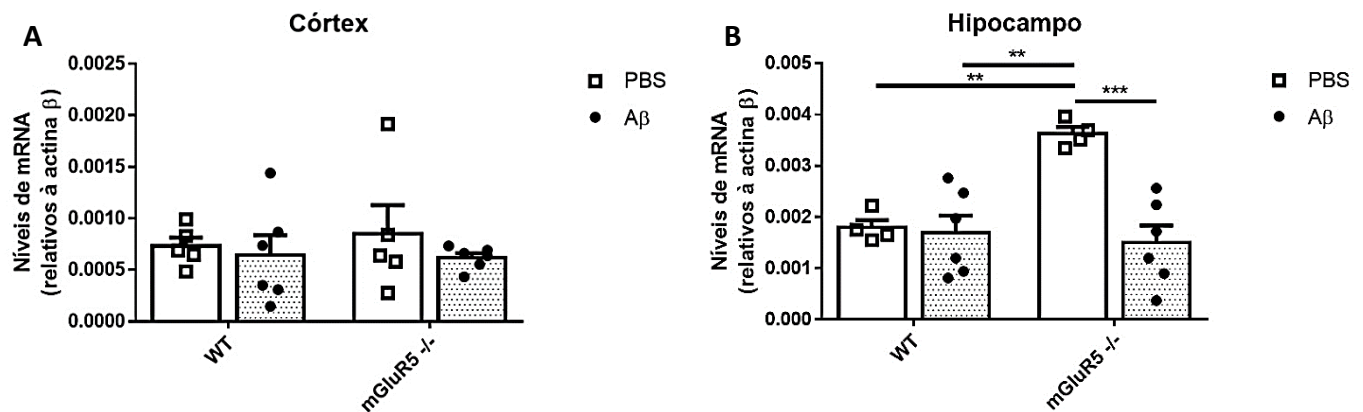
#### 4.4. Os níveis de mRNA de C3 apresentaram elevação apenas no hipocampo de fêmeas mGluR5<sup>-/-</sup>

Tendo em vista o papel do sistema complemento na patologia da DA e de outras doenças neurodegenerativas (Alexander *et al.*, 2008) e nos mecanismos de perda sináptica abordados no trabalho de Hong *et al.* (2016), decidimos verificar, através da técnica de qPCR, se mGluR5 seria capaz de alterar a expressão de C3, um componente central da cascata do complemento, em fêmeas e machos WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> PBS e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$ , visto que o mGluR5 serve como co-receptor do peptídeo A $\beta$  (Um *et al.*, 2013).

Não houve diferença nos níveis de mRNA de C3 no hipocampo de camundongos machos em nenhum dos grupos analisados (figura 6). Com relação às fêmeas, enquanto não foram observadas diferenças entre os grupos no córtex (figura 7A), houve um aumento significativo de C3 no hipocampo de camundongos fêmea mGluR5<sup>-/-</sup> PBS, quando comparado aos grupos WT PBS, WT A $\beta$  e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  (figura 7B).



**Figura 6.** Não houve diferença nos níveis de mRNA de C3 entre os machos WT PBS, WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> PBS e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$ . O gráfico mostra os níveis de mRNA de C3 determinados por RT-qPCR. O RNA total foi extraído do hipocampo de machos WT PBS (n=3), WT A $\beta$  (n=5), mGluR5<sup>-/-</sup> PBS (n=4) e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  (n=5) de 12 a 15 meses. As reações foram feitas em triplicatas e normalizadas pelos níveis de mRNA de actina  $\beta$ . Os dados representam a média  $\pm$  SEM.

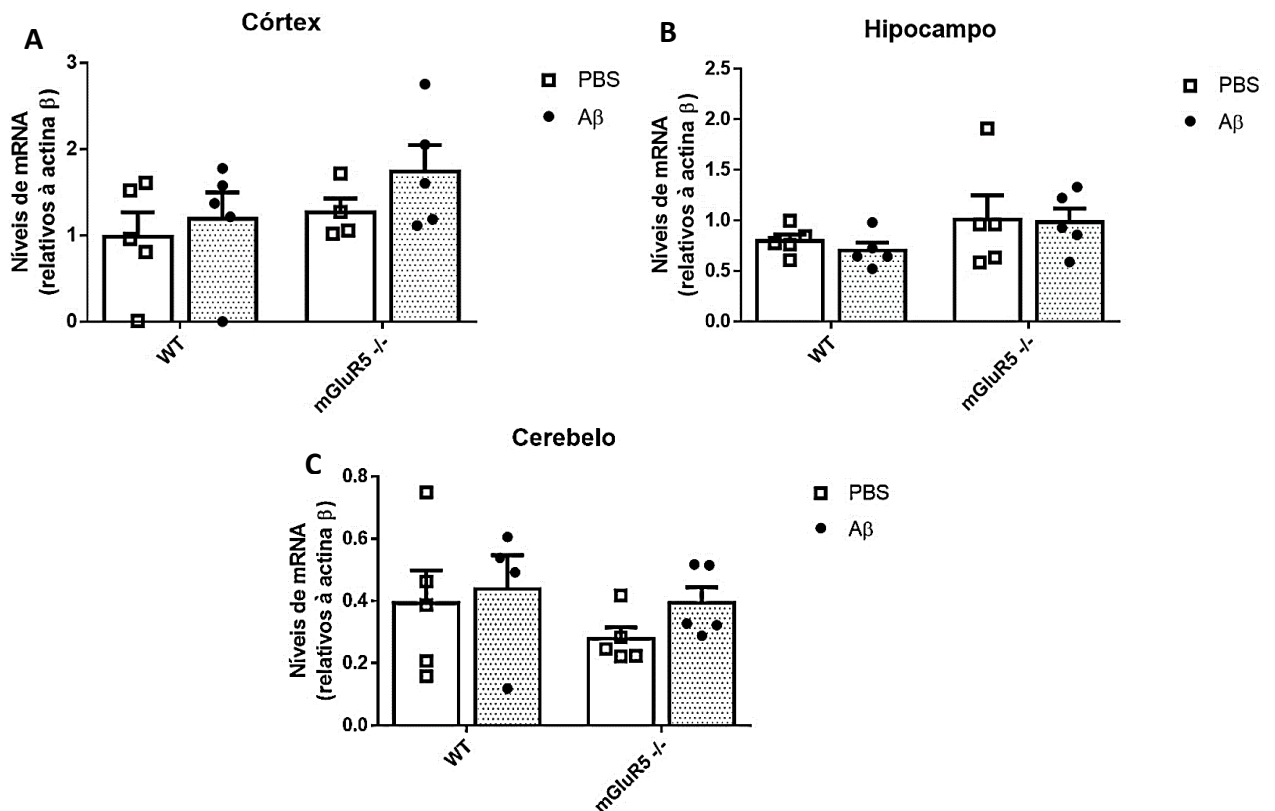


**Figura 7.** Houve uma elevação nos níveis de mRNA de C3 em camundongos fêmeas  $mGluR5^{-/-}$  PBS quando comparadas aos grupos WT PBS, WT A $\beta$  e  $mGluR5^{-/-}$  A $\beta$ . O gráfico mostra os níveis de mRNA de C3 determinados por RT-qPCR. O RNA total foi extraído do córtex (A) e hipocampo (B) de fêmeas WT PBS (n=5-4), WT A $\beta$  (n=6),  $mGluR5^{-/-}$  PBS (n=5-4) e  $mGluR5^{-/-}$  A $\beta$  (n=6) de 12 a 16 meses de idade. As reações foram feitas em triplicatas e normalizadas pelos níveis de mRNA de actina  $\beta$ . Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$  no teste *two way* ANOVA.

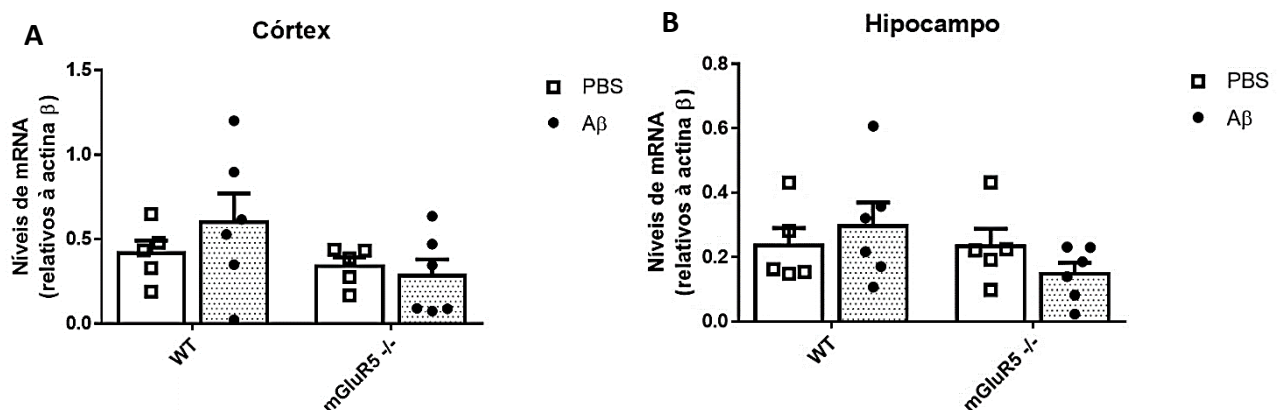
#### 4.5. Não houve alteração nos níveis de mRNA de CX3CL1 em machos e fêmeas

O papel de CX3CL1 na doença de Alzheimer ainda é controverso, assim como em outros contextos patológicos (Sheridan; Murphy, 2013; Lauro *et al.*, 2015). Sabe-se que a sinalização CX3CL1-CX3CR1 é fundamental para o controle da atividade das micróglias (Hatori *et al.*, 2002; Cardona *et al.*, 2006; Lauro *et al.*, 2015) e que apresenta papel relevante nos mecanismos de poda sináptica durante o desenvolvimento (Sheridan; Murphy, 2013). Por isso, decidimos analisar se a injeção do peptídeo A $\beta$  ou o *knockout* de mGluR5 teria alguma influência nos níveis de mRNA desta quimiocina.

Não foram encontradas diferenças nos níveis de mRNA de CX3CL1 entre os grupos WT PBS, WT A $\beta$ ,  $mGluR5^{-/-}$  PBS e  $mGluR5^{-/-}$  A $\beta$  no córtex (figura 8A), hipocampo (figura 8B) e cerebelo (figura 8C) de machos de 12 a 15 meses de idade. Também não observamos diferença entre estes grupos no córtex (figura 9A) e hipocampo (figura 9B) de fêmeas de 12 a 16 meses de idade, embora exista uma tendência de redução da expressão no grupo  $mGluR5^{-/-}$  A $\beta$ .



**Figura 8.** Não houve diferença nos níveis de mRNA de CX3CL1 no córtex, hipocampo ou cerebelo de machos WT PBS, WT Aβ, mGluR5<sup>-/-</sup> PBS e mGluR5<sup>-/-</sup> Aβ. O gráfico mostra os níveis de mRNA de CX3CL1 determinados por RT-qPCR. O RNA total foi extraído do córtex (A), hipocampo (B) e cerebelo (C) de machos WT PBS (n =5), WT Aβ (n=5-5-4), mGluR5<sup>-/-</sup> PBS (n=4-5-5) e mGluR5<sup>-/-</sup> Aβ (n=5) de 12 a 15 meses. As reações foram feitas em triplicatas e normalizadas pelos níveis de mRNA de actina β. Os dados representam a média ± SEM.



**Figura 9.** Não houve diferença nos níveis de mRNA de CX3CL1 no córtex e hipocampo de fêmeas WT PBS, WT Aβ, mGluR5<sup>-/-</sup> PBS e mGluR5<sup>-/-</sup> Aβ. O gráfico mostra os níveis de mRNA de CX3CL1 determinados por RT-qPCR. O RNA total foi extraído do córtex (A) e hipocampo (B) de fêmeas WT PBS (n =5), WT Aβ

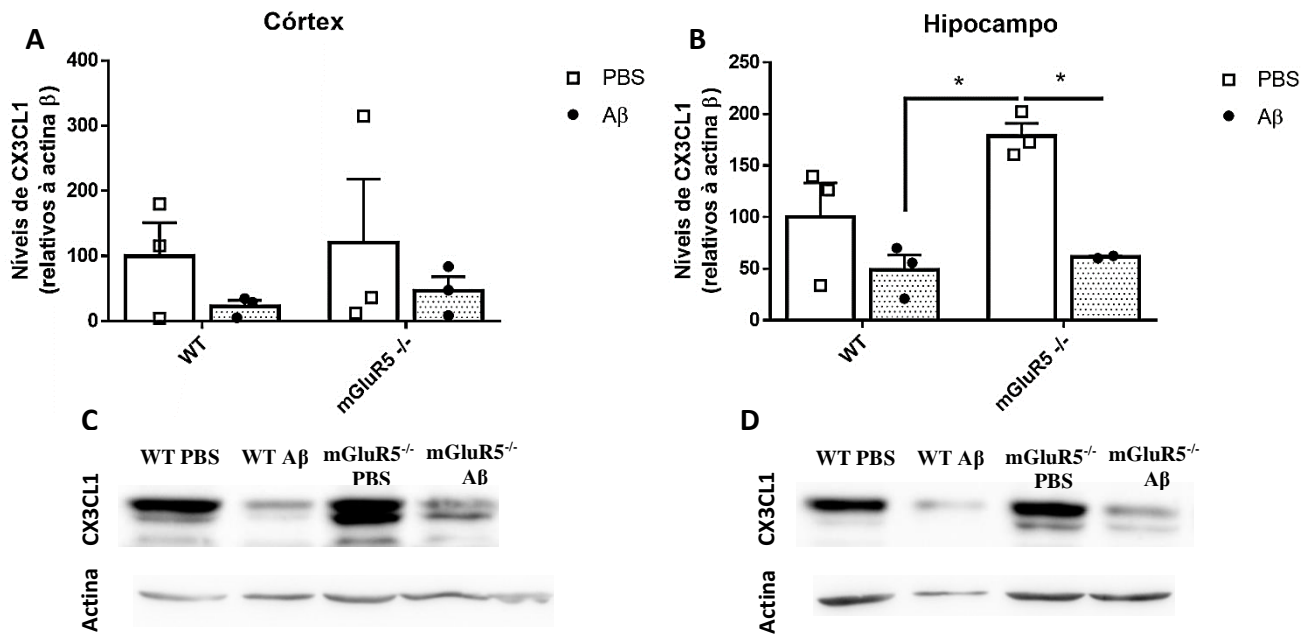
(n=6), mGluR5<sup>-/-</sup> PBS (n=5) e mGluR5<sup>-/-</sup> Aβ (n=6) de 12 a 16 meses. As reações foram feitas em triplicatas e normalizadas pelos níveis de mRNA de actina β. Os dados representam a média ± SEM.

#### 4.6. Os níveis proteicos de CX3CL1 mostraram-se reduzidos no hipocampo de fêmeas mGluR5<sup>-/-</sup> Aβ.

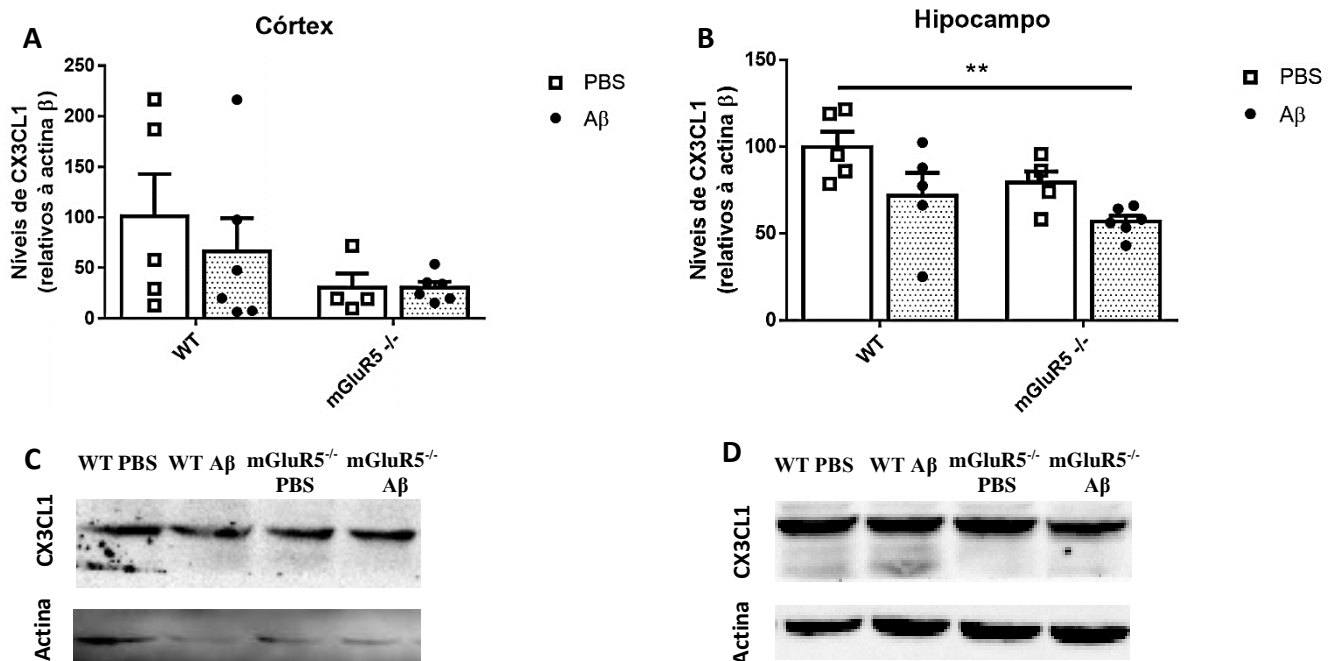
Visto que não encontramos diferenças nos níveis de mRNA de CX3CL1 para os diferentes grupos de machos e fêmeas decidimos verificar, através da técnica de *western blot* se os níveis proteicos desta quimiocina estariam alterados no córtex e hipocampo destes animais.

Os dados não indicaram alteração na expressão de CX3CL1 entre os diferentes grupos no córtex de machos de 12 a 15 meses de idade (figuras 10A e 10C). Embora a quantificação dos níveis proteicos de CX3CL1 no hipocampo tenha demonstrado uma elevação no grupo mGluR<sup>-/-</sup> PBS, não é possível afirmar que este resultado seja verdadeiro devido ao N reduzido (figuras 10B e 10D). Desse modo, faz-se necessária a repetição do experimento no córtex e hipocampo para confirmação dos resultados.

Quanto às fêmeas, não foram observadas diferenças na expressão de CX3CL1 no córtex (figura 11A), sendo necessária a repetição do experimento devido à impossibilidade de realizar uma quantificação confiável da actina (figura 11C). Em oposição, foi observada redução significativa nos níveis proteicos de CX3CL1 no hipocampo de fêmeas mGluR5<sup>-/-</sup> Aβ quando comparado ao grupo WT PBS (figuras 11B e 11D).



**Figura 10.** Houve uma aparente elevação nos níveis de CX3CL1 no hipocampo de machos mGluR5<sup>-/-</sup>. O gráfico mostra a quantificação dos níveis proteicos de CX3CL1 determinados por *western blot* no córtex (A) e hipocampo (B) de machos WT PBS (n = 3), WT Aβ (n = 3), mGluR5<sup>-/-</sup> PBS (n = 3) e mGluR5<sup>-/-</sup> Aβ (n = 2) de 12 a 15 meses de idade. São apresentadas imagens representativas do *western blot* do córtex (C) e hipocampo (D). Os dados representam a média ± SEM. \* representa p < 0,05 no teste *two way* ANOVA.



**Figura 11.** Houve uma redução na expressão de CX3CL1 em camundongos fêmea mGluR5<sup>-/-</sup> Aβ quando comparado ao grupo WT PBS. O gráfico mostra a quantificação dos níveis proteicos de CX3CL1 determinados por *western blot* no córtex (A) e hipocampo (B) de fêmeas WT PBS (n = 5), WT Aβ (n = 5),

mGluR5<sup>-/-</sup> PBS (n=4-5) e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  (n=6) de 12 a 16 meses de idade. São apresentadas imagens representativas do *western blot* do córtex (**C**) e hipocampo (**D**). Os dados representam a média  $\pm$  SEM.\*\* representa  $p < 0,01$  no teste *two way* ANOVA.

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que, como esperado, tanto o A $\beta$ , quanto o *knockout* de mGluR5 foram capazes de induzir déficit de memória (Lu *et al.*, 1997; Figueiredo *et al.*, 2013; Bellozi *et al.*, 2016). Um dos efeitos conhecidos da deleção de mGluR5 no contexto da DA é a diminuição do déficit cognitivo, acompanhada de redução de oligômeros e placas de A $\beta$  (Hamilton *et al.*, 2014). Apesar de não significativos, os resultados apresentados no presente trabalho mostram uma tendência à melhora da performance cognitiva no reconhecimento de novo objeto dos machos mGluR5<sup>-/-</sup> submetidos a injeção de A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Contudo, sabe-se que camundongos mGluR5<sup>-/-</sup> apresentam aprendizado prejudicado (Lu *et al.*, 1997), além de piora da neuroinflamação relacionada à idade (Carvalho *et al.*, 2019), o que poderia explicar essa ausência de melhora significativa da memória. Entretanto, como o teste de medo condicionado não produziu resultados apreciáveis, visto que os camundongos WT tratados com A $\beta$  não apresentaram déficit de memória, como esperado, faz-se necessária a realização de novo teste comportamental de memória para confirmação dos resultados obtidos através do reconhecimento de novo objeto.

As micróglia podem ser ativadas por qualquer evento patológico no cérebro (Kettenmann *et al.*, 2013). A microgliose é comumente encontrada tanto em decorrência do processo de envelhecimento, quanto em doenças neurodegenerativas (Conde; Streit, 2006; Von Bernhardt *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2017). Este processo caracteriza-se por alterações na morfologia e na proliferação destas células, tendo sido amplamente observado como um dos sinais patológicos da DA (Xiang *et al.*, 2006). Adicionalmente, sabe-se que camundongos mGluR5<sup>-/-</sup> também apresentam microgliose aos 12 meses de idade (Carvalho *et al.*, 2019). Apesar disso, nossos dados não mostraram aumento do número de micróglia em camundongos WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> ou mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  quando comparado aos animais WT PBS. Contudo, é possível observar nestes animais um perfil morfológico distinto do encontrado no grupo WT PBS, o que pode corresponder à ativação microglial. Micróglia em repouso apresentam corpo celular menor e ramificações mais numerosas e extensas, continuamente monitorando o tecido cerebral. Por outro lado, micróglia ativadas apresentam corpo celular mais volumoso e uma redução no número e tamanho das ramificações (Crotti; Glass, 2015; Simmons *et al.*, 2016). Visualmente as micróglia dos grupos WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  exibem perfil ativado, no entanto a realização de uma análise morfológica é essencial a fim de determinar se a diferença observada é real. Anticorpos como o anti-CD-68 também

podem ser utilizados para este fim visto que este anticorpo marca uma proteína lisossomal que apresenta maior expressão em micróglia e macrófagos ativados (Stankov *et al.*, 2015).

A quimiocina CX3CL1 realiza a comunicação entre as células neuronais que a produzem e as micróglia que possuem o receptor correspondente, CX3CR1 (Rogers *et al.*, 2011). Desse modo, é um dos principais reguladores da atividade das micróglia (Sheridan; Murphy, 2013; Paolicelli *et al.*, 2014). No entanto, o papel da sinalização CX3CL1-CX3CR1 como ativadora ou repressora da atividade destas células, com consequências positivas ou deletórias, depende do contexto analisado. Camundongos com a deleção de CX3CR1 apresentam ativação extensa de micróglia que provoca neurotoxicidade quando estes são submetidos à injeção de LPS, indicando uma função inibidora desta sinalização (Cardona *et al.*, 2006). Em contraste, outros estudos mostram que a deleção deste receptor também pode diminuir a neurotoxicidade mediada pela atividade das micróglia (Denes *et al.*, 2008) ou não ter influência sobre ela (Chen *et al.*, 2016). Numerosos estudos sustentam o papel de CX3CL1 como inibidora da ativação microglial, contribuindo para o controle da expressão de citocinas inflamatórias como IL1- $\beta$  (Chen *et al.*, 2016). Na DA o papel desta sinalização também não é bem definido. Em camundongos transgênicos rTg4510 (modelo de deposição de TAU) a superexpressão de CX3CL1 ameniza a agregação de TAU (Nash *et al.*, 2013), em concordância com estudos conduzidos por diferentes grupos nos quais a deleção de CX3CR1 aumenta a agregação de TAU (Bhaskar *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014). Por outro lado, os trabalhos de Lee *et al.* (2010) e Liu *et al.* (2010) mostram que a depleção deste receptor reduz a deposição de placas amiloides. Estes dados indicam que a ativação microglial pode ser benéfica para determinados aspectos da DA e prejudicial para outros, visto que o aumento da atividade fagocítica de micróglia pela inibição da sinalização CX3CL1-CX3CR1 favorece a eliminação de A $\beta$  e, ao mesmo tempo a superexpressão de CX3CL1 também pode ser benéfica por inibir a atividade pro-inflamatória das micróglia (Prokop *et al.*, 2013).

Quanto à expressão desta quimiocina também são encontrados resultados contraditórios. Enquanto Strobel *et al.* (2015) aponta um aumento da expressão de CX3CL1 em homogenados de tecido cerebral *post mortem* de pacientes com DA, outros dois autores mostram uma diminuição em sua expressão em camundongos APP<sub>swe</sub> (Tg2576) e no cérebro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com DA (Duan *et al.*, 2008; Perea *et al.*, 2018). Nossos resultados não mostraram diferença na expressão de CX3CL1 em machos WT A $\beta$ , mGluR5<sup>-/-</sup> e mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$  quando comparados aos animais controle. Em fêmeas houve diminuição da expressão de CX3CL1 apenas em nível proteico no hipocampo de camundongos mGluR5<sup>-/-</sup> A $\beta$ , embora os camundongos mGluR5<sup>-/-</sup> também apresentem uma tendência à diminuição

quando comparados a camundongos controles. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em trabalhos anteriores do nosso grupo no contexto da doença de Huntington, onde apenas a combinação de dois insultos foi capaz de induzir redução na expressão de CX3CL1, sendo estes o *knockout* de mGluR5 e a presença da huntingtina mutante, havendo uma diminuição não significativa nos animais mGluR5<sup>-/-</sup> (Carvalho *et al.*, 2019). Interessantemente, o gene que codifica a CX3CL1 é alvo do fator de transcrição que silencia o elemento repressor 1 (REST) (Soldati *et al.*, 2013) e trabalhos ainda não publicados do nosso grupo mostram que mGluR5 é capaz de controlar a expressão de REST. Mais experimentos são necessários para verificar se é possível estabelecer um paralelo entre a ativação de micróglia e a redução nos níveis de CX3CL1 em fêmeas.

O sistema complemento tem sido relacionado com a patologia da doença de Alzheimer desde o início dos anos 80, onde C3 foi encontrado em associação com placas amiloides (Eikelenboom; Stam, 1984). Diversos estudos demonstram a ativação da cascata do complemento na doença de Alzheimer, havendo evidências tanto de que esta cascata seja benéfica quanto prejudicial para o desenvolvimento da doença (Shen; Meri, 2003). Como demonstrado no trabalho de Hong *et al.* (2016) a injeção de A $\beta$ <sub>1-40</sub> foi capaz de induzir aumento na expressão de C3 e C1q, que se mostrou diretamente relacionada com a perda sináptica observada na DA. Além disso, já foi observado aumento expressivo nos níveis de C3 e de outros componentes do sistema complemento em decorrência da idade (Reichwald *et al.*, 2009). Não houve diferenças significativas nos níveis de mRNA de C3 de machos em nenhum dos grupos e regiões cerebrais analisadas em nosso trabalho. Curiosamente, em fêmeas a expressão de C3 no hipocampo foi mais elevada no grupo mGluR5<sup>-/-</sup> quando comparado ao restante dos grupos. A injeção de A $\beta$ <sub>1-42</sub> pode não ter sido capaz de induzir expressão estatisticamente significativa de C3 devido ao já mencionado aumento natural deste componente do complemento em camundongos mais velhos (Reichwald *et al.*, 2009). Pode-se supor também que o efeito da idade na indução da expressão de C3 é mais significativo em animais mGluR5<sup>-/-</sup> e que o A $\beta$ <sub>1-42</sub> interfere com os mecanismos que provocam a expressão idade-dependente de C3 em camundongos mGluR5<sup>-/-</sup>. Novas análises são necessárias para averiguar os níveis de outros componentes da cascata do complemento em fêmeas e machos e para caracterizar possíveis déficits cognitivos associados em fêmeas.

Outros aspectos devem ser considerados na análise destes resultados. O fator tempo pós-injeção de A $\beta$  é de grande relevância visto que a expressão de C3 e CX3CL1 foi averiguada com 8 dias pós-injeção nos machos e 3 dias nas fêmeas, havendo a possibilidade de não detecção, nos machos, de alterações que ocorreram em tempos mais precoces. Já a

constatação de diferenças na expressão apenas no hipocampo de fêmeas e não em outras regiões cerebrais é previsível, visto que o hipocampo se encontra mais próximo do local de injeção e é mais vulnerável às alterações fisiopatológicas da DA (Braak; Braak, 1991). Apesar da possibilidade de que o fator tempo pós injeção esteja influenciando as diferenças de expressão entre machos e fêmeas verificadas no presente estudo, é imprescindível considerar a influência do sexo dos animais modelo nos resultados obtidos. Em trabalho ainda não publicado, nosso grupo e colaboradores mostram que a via autofágica na DA é afetada de maneiras diferentes dependendo do sexo estudado. Estas diferenças se tornam ainda mais relevantes considerando-se que a incidência da DA em mulheres é maior do que em homens (Seshadri *et al.*, 1997; Podcasy; Epperson, 2016) e, apesar disso, a grande maioria das pesquisas existentes é realizada em camundongos machos. Em vista disso, faz-se necessária a realização de novos estudos em que um comparativo entre machos e fêmeas seja estabelecido para se estudar os efeitos da ablação do mGluR5 na DA.

A relação do mGluR5 com hormônios estrógenos e andrógenos em contextos comportamentais já foi observada em diferentes estudos. Sabe-se que o estradiol pode agir sobre o núcleo accumbens (NAc), uma região envolvida no sistema de recompensa, por meio da modulação da plasticidade de espinhas dendríticas (Peterson *et al.*, 2015). Este hormônio provoca redução na densidade sináptica no NAc que está ligada ao abuso de drogas (Staffend *et al.*, 2011). Esta diminuição na densidade sináptica, bem como o aumento da autoadministração de cocaína em fêmeas de rato é dependente de mGluR5 (Peterson *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2016). Além da influência no sistema de recompensa, o estradiol também facilita a sensibilização locomotora induzida pela cocaína e esta facilitação também é dependente de mGluR5 (Martinez *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que o estradiol age no estriado de fêmeas, provocando alterações na neurotransmissão sináptica e em comportamentos relacionados ao controle motor (Grove-Strawser *et al.*, 2010). Neste cenário, este hormônio se liga a receptores de estrogênio que por sua vez se acoplam aos receptores mGluR5 e mGluR3 culminando com a fosforilação de CREB realizada através da ativação de MAPKs (Grove-Strawser *et al.*, 2010), provendo um mecanismo pelo qual o estradiol é capaz de modular a fisiologia do estriado. Em machos, demonstrou-se que a administração de dihidrotestosterona, um agonista de receptores andrógenos, em ratos castrados foi capaz de reduzir a densidade sináptica também de maneira dependente de mGluR5, no entanto em uma região do NAc diferente daquela afetada pelo estradiol (Gross *et al.*, 2018). Portanto, a associação entre mGluR5 e os hormônios femininos e masculinos pode estar entre os

mecanismos que fundamentam os resultados distintos entre fêmeas e machos encontrados no presente trabalho.

Como coerentemente discutido por Shansky (2019), apesar de ainda prevalecer a crença de que dados obtidos em fêmeas são mais variáveis do que os obtidos em machos, já foi demonstrado através da meta-análise de mais de 300 estudos da área de neurociência que machos e fêmeas geram resultados com variabilidade similar, independentemente do ciclo estral dos animais utilizados (Prendergast *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2016). Camundongos machos dominantes possuem em média seis vezes mais testosterona que seus subordinados (Machida *et al.*, 1981), entretanto essa variação não é levada em conta nas análises dos resultados. Em oposição às fêmeas, cujos dados são considerados não interpretáveis caso não haja um controle cuidadoso do ciclo dos animais utilizados. Tanto a testosterona quanto o estrógeno são poderosos neuromoduladores (McEwen *et al.*, 2015), logo a variação de ambos deveria ser considerada. É cada vez mais evidente a necessidade da ampliação do uso de fêmeas nos estudos científicos, sobretudo em contextos em que diferenças entre os sexos possam prejudicar a extrapolação dos dados para a população humana, como é o caso da doença de Alzheimer.

## 6. CONCLUSÕES

O mGluR5 possui um papel de destaque na patologia da DA. Visto que as alterações encontradas em nossos dados foram dependentes do *knockout* deste receptor, o presente trabalho demonstra a relevância do mGluR5 para a expressão de C3 e CX3CL1, duas proteínas envolvidas com a perda sináptica preponderante para os déficits cognitivos observados na DA. Ademais, as diferenças de expressão encontradas parecem depender do sexo dos animais utilizados, ressaltando a importância da condução de pesquisas científicas que utilizem modelos de ambos os sexos.

## 7. PERSPECTIVAS

São necessários novos testes para avaliação da expressão de proteínas envolvidas na poda sináptica em um tempo mais tardio em fêmeas e em um tempo mais precoce em machos para que possa ser determinado se as variações encontradas no presente estudo são mesmo ligadas ao sexo. Também será verificada a variação da expressão de outras proteínas que participem da perda sináptica complemento mediada, tais como C1q, TGF- $\beta$  e CX3CR1. Adicionalmente, será avaliada a existência de microgliose e déficits cognitivos nas fêmeas e a perda neuronal e sináptica em ambos os sexos. Posteriormente, utilizaremos outros modelos da DA para melhor elucidação do papel do mGluR5 na perda sináptica complemento-mediada.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J. J.; ANDERSON, A. J.; BARNUM, S. R.; STEVENS, B.; TENNER, A. J. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation--neuro-protection and -degeneration. **J Neurochem**, 107, n. 5, p. 1169-1187, Dec 2008.

BALAZS, R.; MILLER, S.; ROMANO, C.; DE VRIES, A.; CHUN, Y.; COTMAN, C. W. Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. **J Neurochem**, 69, n. 1, p. 151-163, Jul 1997.

BASTRIKOVA, N.; GARDNER, G. A.; REECE, J. M.; JEROMIN, A.; DUDEK, S. M. Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 8, p. 3123-3127, Feb 26 2008.

BAZAN, J. F.; BACON, K. B.; HARDIMAN, G.; WANG, W.; SOO, K.; ROSSI, D.; GREAVES, D. R.; ZLOTNIK, A.; SCHALL, T. J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **Nature**, 385, n. 6617, p. 640-644, Feb 13 1997.

BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. **Biol Sex Differ**, 7, p. 34, 2016.

BELLOZI, P. M.; LIMA, I. V.; DORIA, J. G.; VIEIRA, E. L.; CAMPOS, A. C.; CANDELARIO-JALIL, E.; REIS, H. J.; TEIXEIRA, A. L.; RIBEIRO, F. M. *et al.* Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BEZ235 (dactolisib) on amyloid-beta 1-42 induced neurotoxicity and memory impairment. **Sci Rep**, 6, p. 25226, May 4 2016.

BHASKAR, K.; KONERTH, M.; KOKIKO-COCHRAN, O. N.; CARDONA, A.; RANSOHOFF, R. M.; LAMB, B. T. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. **Neuron**, 68, n. 1, p. 19-31, Oct 6 2010.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathol**, 82, n. 4, p. 239-259, 1991.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11 ed ed. McGraw-Hill Education LLC., 2018. (The Pharmacological Basis of Therapeutics.

C.A. DAVIES, D. M. A. M., P.Q. Sumpter and P.O. Yates. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, 78, n. 2, p. 151-164 1987.

CAMERON, B.; LANDRETH, G. E. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, 37, n. 3, p. 503-509, Mar 2010.

CARDONA, A. E.; PIORO, E. P.; SASSE, M. E.; KOSTENKO, V.; CARDONA, S. M.; DIJKSTRA, I. M.; HUANG, D.; KIDD, G.; DOMBROWSKI, S. *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. **Nat Neurosci**, 9, n. 7, p. 917-924, Jul 2006.

CARVALHO, T. G.; ALVES-SILVA, J.; DE SOUZA, J. M.; REAL, A.; DORIA, J. G.; VIEIRA, E. L. M.; GOMES, G. F.; DE OLIVEIRA, A. C.; MIRANDA, A. S. *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 ablation accelerates age-related neurodegeneration and neuroinflammation. **Neurochem Int**, 126, p. 218-228, Jun 2019.

CHEN, P.; ZHAO, W.; GUO, Y.; XU, J.; YIN, M. CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's Disease: A Target for Neuroprotection. **Biomed Res Int**, 2016, p. 8090918, 2016.

CHO, S. H.; SUN, B.; ZHOU, Y.; KAUPPINEN, T. M.; HALABISKY, B.; WES, P.; RANSOHOFF, R. M.; GAN, L. CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. **J Biol Chem**, 286, n. 37, p. 32713-32722, Sep 16 2011.

CONDE, J. R.; STREIT, W. J. Microglia in the aging brain. **J Neuropathol Exp Neurol**, 65, n. 3, p. 199-203, Mar 2006.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 37, p. 205-237, 1997.

CROTTI, A.; GLASS, C. K. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. **Trends Immunol**, 36, n. 6, p. 364-373, Jun 2015.

DANI, M.; WOOD, M.; MIZOGUCHI, R.; FAN, Z.; WALKER, Z.; MORGAN, R.; HINZ, R.; BIJU, M.; KURUVILLA, T. *et al.* Microglial activation correlates in vivo with both tau and amyloid in Alzheimer's disease. **Brain**, 141, n. 9, p. 2740-2754, Sep 1 2018.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L.; GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, 8, n. 6, p. 752-758, Jun 2005.

DAVIES, D. S.; MA, J.; JEGATHEES, T.; GOLDSBURY, C. Microglia show altered morphology and reduced arborization in human brain during aging and Alzheimer's disease. **Brain Pathol**, 27, n. 6, p. 795-808, Nov 2017.

DE ROO, M.; KLAUSER, P.; MULLER, D. LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines. **PLoS Biol**, 6, n. 9, p. e219, Sep 9 2008.

DECKER, H.; LO, K. Y.; UNGER, S. M.; FERREIRA, S. T.; SILVERMAN, M. A. Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. **J Neurosci**, 30, n. 27, p. 9166-9171, Jul 7 2010.

DEJANOVIC, B.; HUNTLEY, M. A.; DE MAZIERE, A.; MEILANDT, W. J.; WU, T.; SRINIVASAN, K.; JIANG, Z.; GANDHAM, V.; FRIEDMAN, B. A. *et al.* Changes in the Synaptic Proteome in Tauopathy and Rescue of Tau-Induced Synapse Loss by C1q Antibodies. **Neuron**, 100, n. 6, p. 1322-1336 e1327, Dec 19 2018.

DEKOSKY, S. T.; SCHEFF, S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. **Ann Neurol**, 27, n. 5, p. 457-464, May 1990.

DENES, A.; FERENCZI, S.; HALASZ, J.; KORNYEI, Z.; KOVACS, K. J. Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. **J Cereb Blood Flow Metab**, 28, n. 10, p. 1707-1721, Oct 2008.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, 51, n. 1, p. 7-61, Mar 1999.

DUAN, R. S.; YANG, X.; CHEN, Z. G.; LU, M. O.; MORRIS, C.; WINBLAD, B.; ZHU, J. Decreased fractalkine and increased IP-10 expression in aged brain of APP(swe) transgenic mice. **Neurochem Res**, 33, n. 6, p. 1085-1089, Jun 2008.

EHLERS, M. D.; HEINE, M.; GROG, L.; LEE, M. C.; CHOQUET, D. Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity. **Neuron**, 54, n. 3, p. 447-460, May 3 2007.

EIKELNBOOM, P.; STAM, F. C. An immunohistochemical study on cerebral vascular and senile plaque amyloid in Alzheimer's dementia. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, 47, n. 1, p. 17-25, 1984.

EVANS, D. A.; FUNKENSTEIN, H. H.; ALBERT, M. S.; SCHERR, P. A.; COOK, N. R.; CHOWN, M. J.; HEBERT, L. E.; HENNEKENS, C. H.; TAYLOR, J. O. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. **JAMA**, 262, n. 18, p. 2551-2556, Nov 10 1989.

FALCO, A. D.; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. DOENÇA DE ALZHEIMER: HIPÓTESES ETIOLÓGICAS E PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO. . **Química Nova**, 39 n. 1, p. 63-80, Jan, 2016 2016.

FASULO, L.; UGOLINI, G.; VISINTIN, M.; BRADBURY, A.; BRANCOLINI, C.; VERZILLO, V.; NOVAK, M.; CATTANEO, A. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. **J Neurochem**, 75, n. 2, p. 624-633, Aug 2000.

FIGUEIREDO, C. P.; CLARKE, J. R.; LEDO, J. H.; RIBEIRO, F. C.; COSTA, C. V.; MELO, H. M.; MOTA-SALES, A. P.; SARAIVA, L. M.; KLEIN, W. L. *et al.* Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight abeta oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. **J Neurosci**, 33, n. 23, p. 9626-9634, Jun 5 2013.

FONSECA, M. I.; ZHOU, J.; BOTTO, M.; TENNER, A. J. Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, 24, n. 29, p. 6457-6465, Jul 21 2004.

FREEL, S.; SEEHER, K.; CHOWDHARY, N.; SIVANANTHAN, S.; POT, A. M. Towards a dementia plan: a WHO guide. **World Health Organization (WHO): Geneva**, p. 78, 2018.

FUHRMANN, M.; BITTNER, T.; JUNG, C. K.; BURGOLD, S.; PAGE, R. M.; MITTEREGGER, G.; HAASS, C.; LAFERLA, F. M.; KRETZSCHMAR, H. *et al.* Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. **Nat Neurosci**, 13, n. 4, p. 411-413, Apr 2010.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nat Rev Immunol**, 2, n. 5, p. 346-353, May 2002.

FURUKAWA, K.; BARGER, S. W.; BLALOCK, E. M.; MATTSON, M. P. Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. **Nature**, 379, n. 6560, p. 74-78, Jan 4 1996.

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

GERBER, U.; GEE, C. E.; BENQUET, P. Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. **Curr Opin Pharmacol**, 7, n. 1, p. 56-61, Feb 2007.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C.; GAGE, F. H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, 140, n. 6, p. 918-934, Mar 19 2010.

GRAY, L.; VAN DEN BUUSE, M.; SCARR, E.; DEAN, B.; HANNAN, A. J. Clozapine reverses schizophrenia-related behaviours in the metabotropic glutamate receptor 5 knockout

mouse: association with N-methyl-D-aspartic acid receptor up-regulation. **Int J Neuropsychopharmacol**, 12, n. 1, p. 45-60, Feb 2009.

GREENAMYRE, J. T.; YOUNG, A. B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 10, n. 5, p. 593-602, Sep-Oct 1989.

GROSS, K. S.; MOORE, K. M.; MEISEL, R. L.; MERMELSTEIN, P. G. mGluR5 Mediates Dihydrotestosterone-Induced Nucleus Accumbens Structural Plasticity, but Not Conditioned Reward. **Front Neurosci**, 12, p. 855, 2018.

GROVE-STRAWSER, D.; BOULWARE, M. I.; MERMELSTEIN, P. G. Membrane estrogen receptors activate the metabotropic glutamate receptors mGluR5 and mGluR3 to bidirectionally regulate CREB phosphorylation in female rat striatal neurons. **Neuroscience**, 170, n. 4, p. 1045-1055, Nov 10 2010.

GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; QUINLAN, M.; TUNG, Y. C.; ZAIDI, M. S.; WISNIEWSKI, H. M. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. **J Biol Chem**, 261, n. 13, p. 6084-6089, May 5 1986.

GUGLIELMOTTO, M.; GILIBERTO, L.; TAMAGNO, E.; TABATON, M. Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. **Front Aging Neurosci**, 2, p. 3, 2010.

GUIMARAES, I. M.; CARVALHO, T. G.; FERGUSON, S. S.; PEREIRA, G. S.; RIBEIRO, F. M. The metabotropic glutamate receptor 5 role on motor behavior involves specific neural substrates. **Mol Brain**, 8, p. 24, Apr 10 2015.

HAMELIN, L.; LAGARDE, J.; DOROTHEE, G.; POTIER, M. C.; CORLIER, F.; KUHNAST, B.; CAILLE, F.; DUBOIS, B.; FILLON, L. *et al.* Distinct dynamic profiles of microglial activation are associated with progression of Alzheimer's disease. **Brain**, 141, n. 6, p. 1855-1870, Jun 1 2018.

HAMILTON, A.; ESSELTINE, J. L.; DEVRIES, R. A.; CREGAN, S. P.; FERGUSON, S. S. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout reduces cognitive impairment and pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. **Mol Brain**, 7, p. 40, May 29 2014.

HATORI, K.; NAGAI, A.; HEISEL, R.; RYU, J. K.; KIM, S. U. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. **J Neurosci Res**, 69, n. 3, p. 418-426, Aug 1 2002.

HENEKA, M. T.; CARSON, M. J.; EL KHOURY, J.; LANDRETH, G. E.; BROSSERON, F.; FEINSTEIN, D. L.; JACOBS, A. H.; WYSS-CORAY, T.; VITORICA, J. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**, 14, n. 4, p. 388-405, Apr 2015.

HIRUMA, H.; KATAKURA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, T.; KAWAKAMI, T. Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms. **J Neurosci**, 23, n. 26, p. 8967-8977, Oct 1 2003.

HONER, W. G. Pathology of presynaptic proteins in Alzheimer's disease: more than simple loss of terminals. **Neurobiol Aging**, 24, n. 8, p. 1047-1062, Dec 2003.

HONG, S.; BEJA-GLASSER, V. F.; NFONOYIM, B. M.; FROUIN, A.; LI, S.; RAMAKRISHNAN, S.; MERRY, K. M.; SHI, Q.; ROSENTHAL, A. *et al.* Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. **Science**, 352, n. 6286, p. 712-716, May 6 2016.

HUA, J. Y.; SMITH, S. J. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. **Nat Neurosci**, 7, n. 4, p. 327-332, Apr 2004.

HUTTON, M.; LENDON, C. L.; RIZZU, P.; BAKER, M.; FROELICH, S.; HOULDEN, H.; PICKERING-BROWN, S.; CHAKRAVERTY, S.; ISAACS, A. *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. **Nature**, 393, n. 6686, p. 702-705, Jun 18 1998.

JARRETT, J. T.; BERGER, E. P.; LANSBURY, P. T., Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, 32, n. 18, p. 4693-4697, May 11 1993.

KANTOR, D. B.; KOLODKIN, A. L. Curbing the excesses of youth: molecular insights into axonal pruning. **Neuron**, 38, n. 6, p. 849-852, Jun 19 2003.

KATZ, L. C.; SHATZ, C. J. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. **Science**, 274, n. 5290, p. 1133-1138, Nov 15 1996.

KERNER, J. A.; STANDAERT, D. G.; PENNEY, J. B., Jr.; YOUNG, A. B.; LANDWEHRMEYER, G. B. Expression of group one metabotropic glutamate receptor subunit mRNAs in neurochemically identified neurons in the rat neostriatum, neocortex, and hippocampus. **Brain Res Mol Brain Res**, 48, n. 2, p. 259-269, Sep 1997.

KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. **Neuron**, 77, n. 1, p. 10-18, Jan 9 2013.

KINNEY, G. G.; BURNO, M.; CAMPBELL, U. C.; HERNANDEZ, L. M.; RODRIGUEZ, D.; BRISTOW, L. J.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate subtype 5 receptors modulate

locomotor activity and sensorimotor gating in rodents. **J Pharmacol Exp Ther**, 306, n. 1, p. 116-123, Jul 2003.

KLEIN, W. L.; STINE, W. B., Jr.; TEPLow, D. B. Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 25, n. 5, p. 569-580, May-Jun 2004.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N. Animal models of Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2, n. 11, Nov 1 2012.

LAUREN, J.; GIMBEL, D. A.; NYGAARD, H. B.; GILBERT, J. W.; STRITTMATTER, S. M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. **Nature**, 457, n. 7233, p. 1128-1132, Feb 26 2009.

LAURO, C.; CATALANO, M.; TRETTEL, F.; LIMATOLA, C. Fractalkine in the nervous system: neuroprotective or neurotoxic molecule? **Ann N Y Acad Sci**, 1351, p. 141-148, Sep 2015.

LAZARONI, T. L.; RASLAN, A. C.; FONTES, W. R.; DE OLIVEIRA, M. L.; BADER, M.; ALENINA, N.; MORAES, M. F.; DOS SANTOS, R. A.; PEREIRA, G. S. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, 97, n. 1, p. 113-123, Jan 2012.

LEE, S.; VARVEL, N. H.; KONERTH, M. E.; XU, G.; CARDONA, A. E.; RANSOHOFF, R. M.; LAMB, B. T. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. **Am J Pathol**, 177, n. 5, p. 2549-2562, Nov 2010.

LEE, S.; XU, G.; JAY, T. R.; BHATTA, S.; KIM, K. W.; JUNG, S.; LANDRETH, G. E.; RANSOHOFF, R. M.; LAMB, B. T. Opposing effects of membrane-anchored CX3CL1 on amyloid and tau pathologies via the p38 MAPK pathway. **J Neurosci**, 34, n. 37, p. 12538-12546, Sep 10 2014.

LENDON, C. L.; ASHALL, F.; GOATE, A. M. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. **JAMA Network Open**, 277, n. 10, p. 825-831, 1997

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, 443, n. 7113, p. 787-795, Oct 19 2006.

LIU, Z.; CONDELLO, C.; SCHAIN, A.; HARB, R.; GRUTZENDLER, J. CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid-beta phagocytosis. **J Neurosci**, 30, n. 50, p. 17091-17101, Dec 15 2010.

LU, Y. M.; JIA, Z.; JANUS, C.; HENDERSON, J. T.; GERLAI, R.; WOJTOWICZ, J. M.; RODER, J. C. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci*, 17, n. 13, p. 5196-5205, 1997 Jul 1 1997.

LUE, L. F.; BRACHOVA, L.; CIVIN, W. H.; ROGERS, J. Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. **J Neuropathol Exp Neurol**, 55, n. 10, p. 1083-1088, Oct 1996.

LUE, L. F.; KUO, Y. M.; ROHER, A. E.; BRACHOVA, L.; SHEN, Y.; SUE, L.; BEACH, T.; KURTH, J. H.; RYDEL, R. E. *et al.* Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, 155, n. 3, p. 853-862, Sep 1999.

MACCIONI, R. B.; CAMBIAZO, V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. **Physiol Rev**, 75, n. 4, p. 835-864, Oct 1995.

MACHIDA, T.; YONEZAWA, Y.; NOUMURA, T. Age-associated changes in plasma testosterone levels in male mice and their relation to social dominance or subordination. **Horm Behav**, 15, n. 3, p. 238-245, Sep 1981.

MARAGOS, W. F.; GREENAMYRE, J. T.; PENNEY JR, J. B.; YOUNG, A. B. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. **Trends in Neurosciences**, 10, n. 2, p. 65-68, FEBRUARY 01, 1987 1987.

MARK, R. J.; BLANC, E. M.; MATTSON, M. P. Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. **Mol Neurobiol**, 12, n. 3, p. 211-224, Jun 1996.

MARTINEZ, L. A.; GROSS, K. S.; HIMMLER, B. T.; EMMITT, N. L.; PETERSON, B. M.; ZLEBNIK, N. E.; FOSTER OLIVE, M.; CARROLL, M. E.; MEISEL, R. L. *et al.* Estradiol Facilitation of Cocaine Self-Administration in Female Rats Requires Activation of mGluR5. **eNeuro**, 3, n. 5, Sep-Oct 2016.

MARTINEZ, L. A.; PETERSON, B. M.; MEISEL, R. L.; MERMELSTEIN, P. G. Estradiol facilitation of cocaine-induced locomotor sensitization in female rats requires activation of mGluR5. **Behav Brain Res**, 271, p. 39-42, Sep 1 2014.

MATTSON, M. P.; CHENG, B.; CULWELL, A. R.; ESCH, F. S.; LIEBERBURG, I.; RYDEL, R. E. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. **Neuron**, 10, n. 2, p. 243-254, Feb 1993.

MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. **J Endocrinol**, 226, n. 2, p. T67-83, Aug 2015.

NASH, K. R.; LEE, D. C.; HUNT, J. B., Jr.; MORGANTI, J. M.; SELENICA, M. L.; MORAN, P.; REID, P.; BROWNLOW, M.; GUANG-YU YANG, C. *et al.* Fractalkine overexpression suppresses tau pathology in a mouse model of tauopathy. **Neurobiol Aging**, 34, n. 6, p. 1540-1548, Jun 2013.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, 308, n. 5726, p. 1314-1318, May 27 2005.

PAOLICELLI, R. C.; BISHT, K.; TREMBLAY, M. E. Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. **Front Cell Neurosci**, 8, p. 129, 2014.

PAOLICELLI, R. C.; BOLASCO, G.; PAGANI, F.; MAGGI, L.; SCIANNI, M.; PANZANELLI, P.; GIUSTETTO, M.; FERREIRA, T. A.; GUIDUCCI, E. *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science**, 333, n. 6048, p. 1456-1458, Sep 9 2011.

PARSONS, C. G.; STOFFLER, A.; DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, 53, n. 6, p. 699-723, Nov 2007.

PATTERSON, C. World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers. **Alzheimer's Disease International (ADI)**, p. 1-48, September 2018 2018.

PEREA, J. R.; LLEO, A.; ALCOLEA, D.; FORTEA, J.; AVILA, J.; BOLOS, M. Decreased CX3CL1 Levels in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Alzheimer's Disease. **Front Neurosci**, 12, p. 609, 2018.

PEREIRA, L. M.; BASTOS, C. P.; DE SOUZA, J. M.; RIBEIRO, F. M.; PEREIRA, G. S. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor alpha. **Neurobiol Learn Mem**, 114, p. 1-9, Oct 2014.

PERRY, E. K. The cholinergic system in old age and Alzheimer's disease. **Age Ageing**, 9, n. 1, p. 1-8, Feb 1980.

PETERSON, B. M.; MERMELSTEIN, P. G.; MEISEL, R. L. Estradiol mediates dendritic spine plasticity in the nucleus accumbens core through activation of mGluR5. **Brain Struct Funct**, 220, n. 4, p. 2415-2422, Jul 2015.

PIGINO, G.; MORFINI, G.; ATAGI, Y.; DESHPANDE, A.; YU, C.; JUNGBAUER, L.; LADU, M.; BUSCIGLIO, J.; BRADY, S. Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 14, p. 5907-5912, Apr 7 2009.

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

PODCASY, J. L.; EPPERSON, C. N. Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. **Dialogues Clin Neurosci**, 18, n. 4, p. 437-446, Dec 2016.

PRENDERGAST, B. J.; ONISHI, K. G.; ZUCKER, I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. **Neurosci Biobehav Rev**, 40, p. 1-5, Mar 2014.

PROKOP, S.; MILLER, K. R.; HEPPNER, F. L. Microglia actions in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol**, 126, n. 4, p. 461-477, Oct 2013.

RAINA, P.; SANTAGUIDA, P.; ISMAILA, A.; PATTERSON, C.; COWAN, D.; LEVINE, M.; BOOKER, L.; OREMUS, M. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. **Ann Intern Med**, 148, n. 5, p. 379-397, Mar 4 2008.

REICHWALD, J.; DANNER, S.; WIEDERHOLD, K. H.; STAUFENBIEL, M. Expression of complement system components during aging and amyloid deposition in APP transgenic mice. **J Neuroinflammation**, 6, p. 35, Nov 17 2009.

REISBERG, B.; FRANSSSEN, E. H. Clinical stages of Alzheimer's disease. **The encyclopedia of visual medicine series**, p. 11-20, 1999.

RENNER, M.; LACOR, P. N.; VELASCO, P. T.; XU, J.; CONTRACTOR, A.; KLEIN, W. L.; TRILLER, A. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. **Neuron**, 66, n. 5, p. 739-754, Jun 10 2010.

RIBEIRO, F. M.; CAMARGOS, E. R.; DE SOUZA, L. C.; TEIXEIRA, A. L. Animal models of neurodegenerative diseases. **Braz J Psychiatry**, 35 Suppl 2, p. S82-91, 2013.

RIBEIRO, F. M.; DEVRIES, R. A.; HAMILTON, A.; GUIMARAES, I. M.; CREGAN, S. P.; PIRES, R. G.; FERGUSON, S. S. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes

motor and biochemical alterations in a mouse model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet**, 23, n. 8, p. 2030-2042, Apr 15 2014.

RIBEIRO, F. M.; VIEIRA, L. B.; PIRES, R. G.; OLMO, R. P.; FERGUSON, S. S. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. **Pharmacol Res**, 115, p. 179-191, Jan 2017.

ROGERS, J. T.; MORGANTI, J. M.; BACHSTETTER, A. D.; HUDSON, C. E.; PETERS, M. M.; GRIMMIG, B. A.; WEEBER, E. J.; BICKFORD, P. C.; GEMMA, C. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. **J Neurosci**, 31, n. 45, p. 16241-16250, Nov 9 2011.

ROHN, T. T.; RISSMAN, R. A.; HEAD, E.; COTMAN, C. W. Caspase Activation in the Alzheimer's Disease Brain: Tortuous and Torturous. **Drug News Perspect**, 15, n. 9, p. 549-557, Nov 2002.

ROTH, A. D.; RAMIREZ, G.; ALARCON, R.; VON BERNHARDI, R. Oligodendrocytes damage in Alzheimer's disease: beta amyloid toxicity and inflammation. **Biol Res**, 38, n. 4, p. 381-387, 2005.

ROY, D. S.; ARONS, A.; MITCHELL, T. I.; PIGNATELLI, M.; RYAN, T. J.; TONEGAWA, S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. **Nature**, 531, n. 7595, p. 508-512, Mar 24 2016.

RUI, Y.; TIWARI, P.; XIE, Z.; ZHENG, J. Q. Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. **J Neurosci**, 26, n. 41, p. 10480-10487, Oct 11 2006.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annu Rev Neurosci**, 22, p. 389-442, 1999.

SCHACHTER, A. S.; DAVIS, K. L. Guidelines for the Appropriate Use of Cholinesterase Inhibitors in Patients with Alzheimer's Disease. **Mol Diag Ther** 11, n. 4, p. 281-288, 1999.

SCHAFER, D. P.; LEHRMAN, E. K.; KAUTZMAN, A. G.; KOYAMA, R.; MARDINLY, A. R.; YAMASAKI, R.; RANSOHOFF, R. M.; GREENBERG, M. E.; BARRES, B. A. *et al.* Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. **Neuron**, 74, n. 4, p. 691-705, May 24 2012.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, 81, n. 2, p. 741-766, Apr 2001.

- SERRANO-POZO, A.; FROSCHE, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 1, n. 1, p. a006189, Sep 2011.
- SESHADRI, S.; WOLF, P. A.; BEISER, A.; AU, R.; MCNULTY, K.; WHITE, R.; D'AGOSTINO, R. B. Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease. The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. **Neurology**, 49, n. 6, p. 1498-1504, Dec 1997.
- SHANSKY, R. M. Are hormones a "female problem" for animal research? **Science**, 364, n. 6443, p. 825-826, May 31 2019.
- SHEN, Y.; MERI, S. Yin and Yang: complement activation and regulation in Alzheimer's disease. **Prog Neurobiol**, 70, n. 6, p. 463-472, Aug 2003.
- SHERIDAN, G. K.; MURPHY, K. J. Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. **Open Biol**, 3, n. 12, p. 130181, Dec 18 2013.
- SHI, Q.; CHOWDHURY, S.; MA, R.; LE, K. X.; HONG, S.; CALDARONE, B. J.; STEVENS, B.; LEMERE, C. A. Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice. **Sci Transl Med**, 9, n. 392, May 31 2017.
- SHOJI, M.; GOLDE, T. E.; GHISO, J.; CHEUNG, T. T.; ESTUS, S.; SHAFFER, L. M.; CAI, X. D.; MCKAY, D. M.; TINTNER, R. *et al.* Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. **Science**, 258, n. 5079, p. 126-129, Oct 2 1992.
- SIMMONS, D. A.; BELICHENKO, N. P.; FORD, E. C.; SEMAAN, S.; MONBUREAU, M.; AIYASWAMY, S.; HOLMAN, C. M.; CONDON, C.; SHAMLOO, M. *et al.* A small molecule p75NTR ligand normalizes signalling and reduces Huntington's disease phenotypes in R6/2 and BACHD mice. **Hum Mol Genet**, 25, n. 22, p. 4920-4938, Nov 15 2016.
- SMALL, S. A.; DUFF, K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. **Neuron**, 60, n. 4, p. 534-542, Nov 26 2008.
- SNYDER, E. M.; NONG, Y.; ALMEIDA, C. G.; PAUL, S.; MORAN, T.; CHOI, E. Y.; NAIRN, A. C.; SALTER, M. W.; LOMBROSO, P. J. *et al.* Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. **Nat Neurosci**, 8, n. 8, p. 1051-1058, Aug 2005.
- SOLDATI, C.; BITHELL, A.; JOHNSTON, C.; WONG, K. Y.; STANTON, L. W.; BUCKLEY, N. J. Dysregulation of REST-regulated coding and non-coding RNAs in a cellular model of Huntington's disease. **J Neurochem**, 124, n. 3, p. 418-430, Feb 2013.

STAFFEND, N. A.; LOFTUS, C. M.; MEISEL, R. L. Estradiol reduces dendritic spine density in the ventral striatum of female Syrian hamsters. **Brain Struct Funct**, 215, n. 3-4, p. 187-194, Jan 2011.

STAMER, K.; VOGEL, R.; THIES, E.; MANDELKOW, E.; MANDELKOW, E. M. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. **J Cell Biol**, 156, n. 6, p. 1051-1063, Mar 18 2002.

STANKOV, A.; BELAKAPOSKA-SRPAANOVA, V.; BITOLJANU, N.; CAKAR, L.; CAKAR, Z.; ROSOKLIJA, G. Visualisation of Microglia with the use of Immunohistochemical Double Staining Method for CD-68 and Iba-1 of Cerebral Tissue Samples in Cases of Brain Contusions. **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)**, 36, n. 2, p. 141-145, 2015.

STEPHAN, A. H.; BARRES, B. A.; STEVENS, B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. **Annu Rev Neurosci**, 35, p. 369-389, 2012.

STEVENS, B.; ALLEN, N. J.; VAZQUEZ, L. E.; HOWELL, G. R.; CHRISTOPHERSON, K. S.; NOURI, N.; MICHEVA, K. D.; MEHALOW, A. K.; HUBERMAN, A. D. *et al.* The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. **Cell**, 131, n. 6, p. 1164-1178, Dec 14 2007.

STROBEL, S.; GRUNBLATT, E.; RIEDERER, P.; HEINSEN, H.; ARZBERGER, T.; AL-SARRAJ, S.; TROAKES, C.; FERRER, I.; MONORANU, C. M. Changes in the expression of genes related to neuroinflammation over the course of sporadic Alzheimer's disease progression: CX3CL1, TREM2, and PPARgamma. **J Neural Transm (Vienna)**, 122, n. 7, p. 1069-1076, Jul 2015.

SUCHER, N. J.; AWOBULUYI, M.; CHOI, Y. B.; LIPTON, S. A. NMDA receptors: from genes to channels. **Trends Pharmacol Sci**, 17, n. 10, p. 348-355, Oct 1996.

SUN, Y.; LAI, M. S.; LU, C. J.; CHEN, R. C. How long can patients with mild or moderate Alzheimer's dementia maintain both the cognition and the therapy of cholinesterase inhibitors: a national population-based study. **Eur J Neurol**, 15, n. 3, p. 278-283, Mar 2008.

TANZI, R. E.; BERTRAM, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. **Cell**, 120, n. 4, p. 545-555, Feb 25 2005.

TERRY, R. D.; MASLIAH, E.; SALMON, D. P.; BUTTERS, N.; DETERESA, R.; HILL, R.; HANSEN, L. A.; KATZMAN, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. **Ann Neurol**, 30, n. 4, p. 572-580, Oct 1991.

TRILLER, A.; CHOQUET, D. New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. **Neuron**, 59, n. 3, p. 359-374, Aug 14 2008.

TROY, C. M.; RABACCHI, S. A.; FRIEDMAN, W. J.; FRAPPIER, T. F.; BROWN, K.; SHELANSKI, M. L. Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. **J Neurosci**, 20, n. 4, p. 1386-1392, Feb 15 2000.

UM, J. W.; KAUFMAN, A. C.; KOSTYLEV, M.; HEISS, J. K.; STAGI, M.; TAKAHASHI, H.; KERRISK, M. E.; VORTMEYER, A.; WISNIEWSKI, T. *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. **Neuron**, 79, n. 5, p. 887-902, Sep 4 2013.

UM, J. W.; NYGAARD, H. B.; HEISS, J. K.; KOSTYLEV, M. A.; STAGI, M.; VORTMEYER, A.; WISNIEWSKI, T.; GUNTHER, E. C.; STRITTMATTER, S. M. Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. **Nat Neurosci**, 15, n. 9, p. 1227-1235, Sep 2012.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Res**, 35, n. Web Server issue, p. 71-74, 2007.

VARADARAJAN, S.; YATIN, S.; AKSENOVA, M.; BUTTERFIELD, D. A. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. **J Struct Biol**, 130, n. 2-3, p. 184-208, Jun 2000.

VON BERNHARDI, R.; EUGENIN-VON BERNHARDI, L.; EUGENIN, J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. **Front Aging Neurosci**, 7, p. 124, 2015.

WALSH, D. M.; KLYUBIN, I.; FADEEVA, J. V.; CULLEN, W. K.; ANWYL, R.; WOLFE, M. S.; ROWAN, M. J.; SELKOE, D. J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, 416, n. 6880, p. 535-539, Apr 4 2002.

WANG, H. W.; PASTERNAK, J. F.; KUO, H.; RISTIC, H.; LAMBERT, M. P.; CHROMY, B.; VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L.; STINE, W. B. *et al.* Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. **Brain Res**, 924, n. 2, p. 133-140, Jan 11 2002.

WILCOCK, G. K.; ESIRI, M. M.; BOWEN, D. M.; SMITH, C. C. Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. **J Neurol Sci**, 57, n. 2-3, p. 407-417, Dec 1982.

WILLARD, S. S.; KOOCHKEKPOUR, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. **Int J Biol Sci**, 9, n. 9, p. 948-959, 2013.

XIANG, Z.; HAROUTUNIAN, V.; HO, L.; PUROHIT, D.; PASINETTI, G. M. Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. **Dis Markers**, 22, n. 1-2, p. 95-102, 2006.

YAMIN, G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. **J Neurosci Res**, 87, n. 8, p. 1729-1736, Jun 2009.

YAN, Y.; WANG, C. Abeta42 is more rigid than Abeta40 at the C terminus: implications for Abeta aggregation and toxicity. **J Mol Biol**, 364, n. 5, p. 853-862, Dec 15 2006.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, 13, n. 134, p. 1-11, 2012.

ZHOU, Q.; HOMMA, K. J.; POO, M. M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. **Neuron**, 44, n. 5, p. 749-757, Dec 2 2004.

ZHU, X. C.; TAN, L.; WANG, H. F.; JIANG, T.; CAO, L.; WANG, C.; WANG, J.; TAN, C. C.; MENG, X. F. *et al.* Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Ann Transl Med**, 3, n. 3, p. 38, Mar 2015.