

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

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM INIBIDOR DA CALCINEURINA  
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

**GIOVANNI FREITAS GOMES**

**BELO HORIZONTE  
2020**

**GIOVANNI FREITAS GOMES**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM INIBIDOR DA CALCINEURINA  
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

**BELO HORIZONTE**

**2020**

043      Gomes, Giovanni Freitas.  
Avaliação dos efeitos de um inibidor da calcineurina em modelos  
experimentais da doença de Alzheimer [manuscrito] / Giovanni Freitas Gomes.  
- 2020.  
136 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Doença de Alzheimer. 3. Calcineurina. 4. Disfunção  
Cognitiva. 5. Microglia. 6. Sobrevivência Celular. I. Oliveira, Antônio Carlos  
Pinheiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências  
Biológicas. III. Título.

CDU: 615

# "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA CALCINEURINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE ALZHEIMER"

**GIOVANNI FREITAS GOMES**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 30 de junho de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

*Natalia Pessoa Rocha*

**PROFA. DRA. NATALIA PESSOA ROCHA**  
THE UNIVERSITY OF TEXAS HEALTH SCIENCE CENTER AT HOUSTON

*Alline Cristina de Campos*

**PROFA. DRA. ALLINE CRISTINA DE CAMPOS**  
FMRP/USP

*Vinicius de Toledo Ribas*

**PROF. DR. VINICIUS DE TOLEDO RIBAS**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

*Leonardo Cruz de Souza*

**PROF. DR. LEONARDO CRUZ DE SOUZA**  
MEDICINA/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

*Antônio Carlos P. de Oliveira*

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

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa Isabella, por todo o amor, por ser minha grande companheira em todos os momentos e por confiar em mim, em nós e em nossos sonhos e objetivos a todo momento. Você é parte desse momento e é parte de todas as minhas conquistas. “Te amo grande!”.

Aos meus pais, Edson e Fátima, por serem meus grandes exemplos, por todo amor ao longo da minha vida, por serem meus grandes incentivadores e por sempre acreditarem em meus sonhos e objetivos. Eu precisaria de infinitas páginas para agradecer tudo o que sempre fazem por mim. Amo vocês.

Ao meu irmão, a todos os meus familiares e aos meus amigos do Pará, que contribuem todos os dias para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao prof. Dr. Antônio Carlos de Oliveira, por me acolher no Laboratório de Neurofarmacologia, por confiar no meu trabalho e no meu potencial, pela amizade que foi construída e pela orientação, não só nesse trabalho, mas na vida. Suas contribuições são fundamentais no meu processo de crescimento profissional diário.

Ao prof. Dr. Helton Reis e à profa. Dra. Luciene Vieira, pelo acolhimento, orientação e pela amizade construída ao longo desses anos.

Às amigas Carla, Paula, Maria Carolina, Suelyn, Anna Luiza, Roberta, Gabriela, Carolina e a todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo Neurofar, por contribuírem diariamente para o meu crescimento pessoal e profissional, pelas contribuições técnicas e científicas nesse trabalho e, especialmente, pela grande amizade construída e que será levada para a vida.

Ao prof. Dr. Cristovam Diniz e à profa. Dra. Márcia Kronka, meus orientadores de iniciação científica e de mestrado, e a todos os amigos do Laboratório de Investigação em Neurodegeneração e Infecção (UFPA), onde comecei minha vida científica, por todas as contribuições que deram e continuam dando ao longo desses anos. Minhas experiências no LNI foram fundamentais para o cientista que sou hoje.

À profa. Dra. Aline Miranda e a equipe do Laboratório de Neurobiologia por colaborarem com o presente trabalho com a realização de ELISA para as dosagens de fatores neurotróficos e citocinas.

À profa. Dra. Fabíola Ribeiro e a equipe do Laboratório de Neuroquímica, por gentilmente me permitirem realizar as genotipagens dos animais transgênicos e as revelações de *western blot* em seu laboratório.

À profa. Dra. Cristina Guatimosim e a equipe do Laboratório de Biologia da Neurotransmissão, por gentilmente me permitirem o uso do vibrátomo para obtenção das fatias histológicas.

Ao prof. Dr. Fabrício Moreira, à profa. Dra. Daniele Aguiar e a todos os membros do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, que colaboram diariamente com os membros de nosso laboratório e por quem temos grande amizade.

Ao Dr. Bernd Fiebich, à Dra. Soraya Saliba e a todos os membros do Laboratório de Psiquiatria Translacional da Universidade de Freiburg, onde realizei os experimentos de cultura organotípica, por terem me acolhido em seu laboratório e em sua cidade e por terem dado contribuições científicas e técnicas significativas para esse trabalho.

À *Alzheimer Forschung Initiative* (AFI) pelo suporte financeiro para minha ida à Freiburg para realização dos experimentos envolvendo culturas organotípicas.

A todos os amigos que fiz em Belo Horizonte e em Minas Gerais e aos amigos da UFMG que foram e são fundamentais para que minha passagem por esse estado seja extremamente agradável e alegre. Agradeço também ao Joaquim, que me acolheu em sua casa em minha chegada a Belo Horizonte e por sua amizade, à Hipólita e família, pela amizade e por me acolherem por muitas vezes em sua família, ao Nilton e família, pela amizade e por me acolherem por muitas vezes em sua família, e a todos os Salesianos Cooperadores de Belo Horizonte, por quem tenho grande amizade e carinho fraternal.

A todos os professores que passaram por minha vida escolar, universitária e científica, por terem sido exemplos e por terem contribuído grandiosamente para minha formação pessoal e profissional.

A todo o corpo técnico, docente e discente do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia (UFMG).

A todo o corpo técnico e docente do Departamento de Farmacologia da UFMG.

À Universidade Federal do Pará, universidade pública, gratuita e de extrema qualidade, onde me formei Biólogo e Mestre em Neurociências e na qual experimentei muitos momentos enriquecedores e que contribuíram para minha formação profissional e crescimento pessoal.

À Universidade Federal de Minas Gerais, universidade pública, gratuita e de extrema qualidade, onde estou me formando Doutor em Farmacologia e na qual vivenciei grandes momentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG, pelo suporte financeiro para realização desse projeto.

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência no mundo, justificando o melhor entendimento de sua fisiopatologia e a busca por novos alvos terapêuticos. Nesse sentido, a calcineurina (CN), uma proteína envolvida em uma série de funções, como plasticidade sináptica, sobrevivência neuronal e resposta imune, tem participação importante na fisiopatologia de DA. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do FK506 (FK), um inibidor da calcineurina, sobre as alterações comportamentais, histológicas e bioquímicas observadas em modelos de neurotoxicidade induzida por NMDA ou A $\beta$  e em um modelo transgênico para DA, além do modelo de cultura organotípica estimuladas com NMDA. Para isso, camundongos C57BL/6 machos, de 8-12 semanas, foram tratados com FK506, nas doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg ou veículo, 80 minutos antes de receberem injeção intrahipocampal de A $\beta$  (400 pmol) ou NMDA (40 nmol), ou ainda solução salina. Para avaliação cognitiva, utilizamos o teste de reconhecimento de objeto novo (TRO). Além disso, avaliamos a viabilidade neuronal, a microgliose e a ativação de vias de sobrevivência celular no hipocampo (HIP) desses animais. Indivíduos que receberam NMDA ou A $\beta$  apresentaram comprometimento na TRO, associado à marcação por *Fluoro-Jade C* (FJC) e microgliose no HIP. O FK teve papel protetor sobre o comprometimento cognitivo em ambos os modelos e reduziu a marcação por FJC e a microgliose no modelo de A $\beta$ . O FK também impediu a redução da expressão de NeuN em culturas organotípicas estimuladas com NMDA. Adicionalmente, nós avaliamos os efeitos do tratamento crônico com FK no modelo transgênico APP/PS1. Para isso, animais machos APP/PS1 ou *littermates*, de 12 meses, foram tratados com FK (5 mg/kg) ou veículo por 30 dias. Utilizamos a tarefa exploratória do campo aberto, o labirinto em cruz elevado (LCE), o teste de interação (IS) e memória social e TRO para avaliação comportamento. Também analisamos a viabilidade neuronal, o conteúdo de placas A $\beta$  e a microgliose no HIP, além dos níveis de fatores neurotróficos e citocinas no HIP e no córtex pré-frontal. O tratamento crônico com FK foi capaz de reverter a alteração comportamental observada no LCE e na IS. Além disso, o FK506 reduziu a microgliose no HIP de animais APP/PS1. Em conjunto, estes resultados demonstram o potencial protetor do FK sobre a patologia observada em modelos de DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, calcineurina, NMDA, A $\beta$ , APP/PS1, FK506, comprometimento cognitivo, micróglia, via de sobrevivência celular.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia worldwide. Thus, a better comprehension of its physiopathology and the search for new therapeutic targets are necessary. In this sense, the calcineurin (CN), a protein involved in various functions, such as synaptic plasticity, neuronal survival and immune response, seems to play an important role in the physiopathology of DA. The aim of the present study was to investigate the effects of FK506 (FK), a calcineurin inhibitor, on behavioral, histological and biochemical changes observed in models of neurotoxicity induced by NMDA or A $\beta$ , in the transgenic mouse model for DA and in organotypic hippocampal slice cultures stimulated with NMDA. For this, male C57BL/6 mice, aged 8 to 12 weeks, were treated with 2.5, 5 or 10 mg/kg of FK or vehicle, 80 minutes before receiving intrahippocampal microinjection of A $\beta$  (400 pmol) or NMDA (40 nmol), or even sterile saline. For cognitive evaluation, we performed the novel object recognition test (NORT). In addition, we evaluated neuronal viability, microgliosis and activation of pro-survival pathways in the hippocampus (HIP) of these mice. We observed impairment in TRO in animals injected with NMDA or A $\beta$ . The behavioral impairment was associated with Fluoro-Jade C staining (FJC) and microgliosis in HIP. The treatment with FK had a protective effect on cognitive impairment in both NMDA and A $\beta$  model and reduced the FJC staining and the microgliosis found in A $\beta$  model. The FK also protected against the reduction of NeuN expression induced by NMDA in organotypic cultures. Additionally, we evaluated the effects of the chronic treatment with FK in the APP/PS1 transgenic model. For this purpose, male APP/PS1 or littermates, aged 12 months, were treated for 30 days with FK (5 mg/kg) or vehicle. Behavioral analysis was performed using open field task (OF), elevated-plus maze (EPM), social interaction (SI) and social memory (SM). We also evaluated neuronal viability, A $\beta$  plaques load, and microgliosis in the HIP and the levels of neurotrophic factors and cytokines in the HIP and in the prefrontal cortex. The chronic treatment with FK reversed the behavioral changes in EPM and SI observed in APP/PS1 mice. In addition, FK treatment reduced the microgliosis found in the CA1 of hippocampus of transgenic animals. Together, these results suggest the potential protective effect of FK in the pathology observed in AD.

Keywords: Alzheimer's disease, calcineurin, NMDA, A $\beta$ , APP/PS1, FK506, cognitive impairment, microglia, cell survival pathways.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clivagem da proteína precursora amiloide (PPA).....	21
Figura 2. Mecanismos que contribuem para a patogêneses de DA.....	23
Figura 3. Papel da resposta imune na patogênese de DA.....	29
Figura 4. Via ativação da calcineurina e estratégica farmacológica de inibição de sua atividade.....	33
Figura 5. A alteração da atividade da calcineurina está associada a DA.....	35
Figura 6. Modelos de microinjeção intrahipocampal de NMDA ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	43
Figura 7. Linha do tempo experimental do tratamento crônico com FK506 em animais transgênicos APP/PS1.....	44
Figura 8. Caracterização das células iba-1-positivas não ameboides e células iba-1-positivas ameboides.....	51
Figura 9. Protocolo de estimulação das culturas organotípicas de fatias de hipocampo.	56
Figura 10. Perfil da presença de crises, quantidade de crises e presença de morte em animais no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA.....	60
Figura 11. Efeitos do tratamento com FK506 sobre a tarefa de reconhecimento de objeto no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA.....	61
Figura 12. Efeitos do tratamento com FK506 sobre colocação por FJC no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA.....	62
Figura 13. Efeitos do tratamento com FK506 sobre a imunomarcação por NeuN no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA.....	63
Figura 14. Efeitos do tratamento com FK506 sobre o perfil microglial na camada polimórfica do GD do hipocampo no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA.....	65
Figura 15. Efeitos do tratamento com FK506 (5 mg/kg) sobre a fosforilação de Akt e Erk no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA.....	67
Figura 16. Efeitos do tratamento com FK506 sobre a expressão de NeuN em culturas organotípicas estimuladas com NMDA.....	68
Figura 17. Efeitos do tratamento com FK506 sobre a expressão Iba-1, GFAP e TNF- $\alpha$ em culturas organotípicas estimuladas com NMDA.....	69
Figura 18. Efeitos do tratamento com FK506 sobre a expressão de fatores neurotróficos em culturas organotípicas estimuladas com NMDA.....	70
Figura 19. Efeitos da depleção da micróglia e do tratamento com FK506 sobre a expressão de NeuN e GFAP em culturas organotípicas depletadas estimuladas com NMDA.....	71

Figura 20. Efeitos do tratamento com FK506 e da depleção da micróglia sobre a expressão de BDNF em culturas organotípicas estimuladas com NMDA.....	71
Figura 21. Efeitos do tratamento com FK506 e da depleção da micróglia sobre a expressão de NGF e TGF $\beta$ em culturas organotípicas depletadas estimuladas com NMDA.....	72
Figura 22. Expressão de fatores associados a estresse oxidativo e apoptose em culturas organotípicas de fatias de hipocampo normais ou depletadas.....	73
Figura 23. Efeitos do tratamento com FK506 sobre a tarefa de reconhecimento de objeto no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ .....	74
Figura 24. Efeitos do tratamento com FK506 sobre colocação por FJC no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ .....	75
Figura 25. Efeitos do tratamento com FK506 sobre a imunomarcagem por NeuN no GD e em CA1 do hipocampo no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ .....	76
Figura 26. Efeitos do tratamento com FK506 sobre o perfil microglial na camada polimórfica do GD do hipocampo no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ .....	78
Figura 27. Efeitos do tratamento com FK506 (5 mg/kg) sobre a fosforilação de Akt e Erk no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ .....	80
Figura 28. Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre a massa e a locomoção de animais TG ou WT.....	81
Figura 29. Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre o comportamento no LCE em indivíduos TG ou WT.....	82
Figura 30. Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre a cognição em indivíduos TG ou WT.....	83
Figura 31. Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre o conteúdo de A $\beta$ <sub>1-42</sub> no hipocampo de indivíduos TG ou WT.....	84
Figura 32. Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre a imunomarcagem por NeuN no hipocampo de indivíduos TG ou WT.....	85
Figura 33. Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre a microgliose no GD do hipocampo de indivíduos TG ou WT.....	86
Figura 34. Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre as concentrações de fatores neurotróficos no hipocampo e no córtex pré-frontal de indivíduos TG ou WT.....	87
Figura 35. Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre as concentrações de citocinas no hipocampo e no córtex pré-frontal de indivíduos TG ou WT.....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de indivíduos utilizados por grupo e por técnica experimental no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA.....	53
Tabela 2. Número de indivíduos utilizados por grupo e por técnica experimental no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	53
Tabela 3. Número de indivíduos utilizados por grupo e por técnica experimental no modelo transgênico APP/PS1.....	54
Tabela 4. Sequências de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para avaliação por meio RT-qPCR.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina

AP-1 – proteína ativadora 1

ATP – adenosina trifosfato

A $\beta$  – amiloide-beta

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE – barreira hematoencefálica

CA – tarefa exploratória do campo aberto

Ca<sup>2+</sup> - cálcio

CaM – calmodulina

CN – calcineurina

COX-2 – ciclo-oxigenase 2

CsA – ciclosporina A

DA – doença de Alzheimer

DO – densidade óptica

FJC – *Fluoro-Jade C*

GD – giro denteado do hipocampo

HIP – hipocampo

ICN – inibidores da calcineurina

ICV – intracerebroventricular

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IL-1 $\beta$  – interleucina-1 beta

IL-2 – interleucina 2

IL-4 – interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

IL-10 – interleucina 10

IMS – teste de interação e memória social

IS – etapa interação social no teste de interação e memória social

LCE – labirinto em cruz elevado

MEF-2 – fator estimulador de miócitos 2

MMP – metaloproteinase-9

MS – etapa de memória social no teste de interação e memória social

mTOR – *mammalian target of rapamycin*

NF- $\kappa$ B – fator nuclear *kappa* B  
NFAT – fator nuclear de células T  
NMDA – ácido N-metil-D-aspartico  
PBS – tampão fosfato salina  
PFA 4 % - paraformaldeído 4 %  
PPA – proteína precursora amiloide  
PS1 – presenilina 1  
PS2 – presenilina 2  
PSD-95 – proteína de densidade pós-sináptica 95  
S1PR – receptor esfingosina-1-fosfato  
SNC – sistema nervoso central  
TBST – tampão tris salina *tween*  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
TRO – tarefa de reconhecimento de objeto novo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
1.1. Doença de Alzheimer: aspectos gerais	17
1.1.1. A forma esporádica da doença de Alzheimer	18
1.1.2. A forma familiar da doença de Alzheimer	19
1.2. A hipótese amiloide para a patogênese da doença de Alzheimer	19
1.3. Excitotoxicidade e doença de Alzheimer	22
1.4. Morte celular na doença de Alzheimer	24
1.5. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer	26
1.6. O papel da resposta imune na doença de Alzheimer	27
1.7. O potencial uso de imunossupressores para o tratamento doença de Alzheimer	29
1.7.1. Os inibidores da calcineurina	31
1.8. O potencial uso terapêutico dos inibidores da calcineurina em doença de Alzheimer	34
<b>2. OBJETIVOS</b>	39
2.1. Objetivo geral	39
2.2. Objetivos específicos	39
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	40
3.1. Modelos <i>in vivo</i>	40
3.1.1. Animais	40
3.1.2. Reagentes	40
3.1.3. Cirurgia estereotáxica	41
3.1.4. Modelo de neurotoxicidade induzida por microinjeção intrahipocampal de NMDA ou A $\beta$ <sub>1-42</sub>	41
3.1.5. Modelo transgênico APP/PS1: tratamento crônico com FK506	44
3.1.6. Tarefa de reconhecimento de objeto novo	45
3.1.7. Labirinto em cruz elevado	45
3.1.8. Campo aberto	46
3.1.9. Interação e memória social	46
3.1.10. Perfusão e microtomia	47
3.1.11. Coloração por <i>Fluoro Jade C</i>	48
3.1.12. Imuno-histoquímica	48
3.1.13. Aquisição, análise e processamento das imagens	48
3.1.14. Estereologia	50
3.1.15. <i>Western blot</i>	51
3.1.16. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	52
3.2. Modelo <i>ex vivo</i>	54
3.2.1. Animais	54
3.2.2. Reagentes	54

3.2.3.	Toxicidade induzida por NMDA em cultura organotípica de fatias de hipocampo .....	55
3.2.4.	Depleção da micróglia em cultura organotípica de fatias de hipocampo .....	55
3.2.5.	PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) .....	56
3.3.	Análise estatística.....	58
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
4.1.	O FK506 não impediu as crises tônico-clônicas ou as mortes induzidas por NMDA.....	59
4.2.	O FK506 impediu o comprometimento cognitivo induzido NMDA...	60
4.3.	O FK506 não impediu a marcação por FJC e a perda neuronal induzidas por NMDA.....	61
4.4.	O FK506, mas não NMDA, alterou o número de células Iba-1-positivas.....	63
4.5.	O FK506 impediu a alteração na fosforilação de Erk <sub>1/2</sub> no hipocampo, mas não de Akt, induzidas por NMDA 24 horas após a microinjeção.....	66
4.6.	O NMDA reduziu a expressão de NeuN em culturas organotípicas, mas não em culturas pré-tratadas com FK506.....	68
4.7.	O NMDA não alterou a expressão de Iba-1, GFAP ou TNF- $\alpha$ em culturas organotípicas.....	68
4.8.	O NMDA não alterou a expressão de fatores neurotróficos em culturas organotípicas.....	69
4.9.	O NMDA não alterou a expressão de NeuN ou de GFAP em culturas organotípicas depletadas.....	70
4.10.	Houve uma tendência de aumento na expressão de BDNF em culturas depletadas e estimuladas com NMDA, mas não em culturas tratadas com FK506.....	71
4.11.	O NMDA não alterou a expressão de NGF e TGF $\beta$ em culturas depletadas.....	72
4.12.	O FK506 não alterou a expressão de genes envolvidos em estresse oxidativo ou em apoptose em culturas organotípicas normais ou em culturas organotípicas depletadas.....	72
4.13.	O FK506 impediu o comprometimento cognitivo induzido por A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	74
4.14.	O FK506 impediu a marcação por FJC induzida por A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	74
4.15.	O A $\beta$ <sub>1-42</sub> não induziu perda neuronal.....	75
4.16.	O FK506 reduziu a microgliose induzida A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	76
4.17.	A $\beta$ <sub>1-42</sub> não alterou os níveis de fosforilação de Erk e Akt.....	79
4.18.	O tratamento crônico com FK506 não alterou a massa ou a mobilidade de animais TG ou WT <i>littermates</i> .....	81

4.19.	O tratamento crônico com FK506 reverteu o comprometimento do comportamento de esquiva observado em indivíduos TG.....	82
4.20.	O tratamento crônico com FK506 reverteu o comprometimento no comportamento de interação social, mas não na tarefa de reconhecimento de objetos ou na avaliação da memória social.....	82
4.21.	O tratamento crônico com FK506 não alterou o conteúdo de placas A $\beta$ encontradas no hipocampo de indivíduos TG.....	84
4.22.	A densidade de neurônios NeuN-positivos no hipocampo não foi alterada pelo genótipo ou pelo tratamento crônico com FK506.....	85
4.23.	O tratamento crônico com FK506 reduziu a microgliose encontrada em CA1 do hipocampo de indivíduos TG, mas não a microgliose encontrada no GD.....	85
4.24.	O tratamento crônico com FK506 não reverteu a redução nos níveis de BDNF no hipocampo de indivíduos TG.....	86
4.25.	O perfil de liberação de citocinas no hipocampo e no córtex pré-frontal não foi alterado pelo genótipo ou pelo tratamento crônico com FK506.....	88
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
5.1.	Efeitos da inibição da calcineurina na neurotoxicidade induzida por NMDA.....	89
5.2.	Efeito da inibição da calcineurina após estímulo com A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	92
5.3.	Efeitos do tratamento crônico com Fk506 em animais APP/PS1....	95
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doença de Alzheimer: aspectos gerais

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência que afeta a população mundial, sendo caracterizada como uma doença neurodegenerativa (ROMBERG *et al.*, 2012). A DA é um transtorno progressivo e debilitante, que se manifesta por deterioração cognitiva, comprometimento das atividades de vida diária e uma variedade de alterações comportamentais (GOTTESMAN; STERN, 2019; LI, XIAO-LING *et al.*, 2014). O principal sinal precoce da doença é a perda de memória recente, que progride para perda de memórias antigas e um estado de incapacidade de se mover ou falar (EL HAJ; KESSELS, 2013), associados a uma série de transtornos neuropsiquiátricos (BAUMGARTNER; RENNER, 2019; CHI *et al.*, 2014; CLARK, CAMILLA N. *et al.*, 2015; RYU, SEUNG HO *et al.*, 2017).

Estima-se que o número de pessoas com algum tipo de demência no mundo em 2016 era de 43,8 milhões (NICHOLS *et al.*, 2019), sendo que os pacientes com DA representam entre 60 e 70 % desse número. Também se observou que a prevalência de demência teve um aumento de 117 % globalmente entre 1990 e 2016, com aumento de 147 % no número de mortes causadas por essas condições para o mesmo período. O aumento da prevalência de DA tem relação com o aumento da expectativa de vida da população mundial, uma vez que a incidência da forma mais comum da doença, conhecida como DA esporádica, é maior em indivíduos com 65 anos ou mais (NIU, 2017), sendo a idade o principal fator de risco para essa condição (CARONE; ASGHARIAN; JEWELL, 2014; SONG; MITNITSKI; ROCKWOOD, 2014). Esses dados chamam atenção dos órgãos de saúde e pesquisa tanto pela atenção às pessoas, que é complexa, quanto pelos impactos econômicos associados (ARRIGHI *et al.*, 2010; LIVINGSTON *et al.*, 2017), uma vez que a estimativa é que até 2050 haja 131 milhões de pessoas com demência no mundo (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2018).

As alterações mais graves da DA acontecem no hipocampo (HIP) e nas regiões corticais e subcorticais, incluindo amígdala e núcleo basal de Meynert (GÖTZ; ITTNER, 2008), sendo que o principal sistema neurotransmissor afetado é o colinérgico (TRAN; YAMADA; NABESHIMA, 2002). As consequências são evidentes, uma vez que a acetilcolina (ACh) possui importante papel no aprendizado, atenção e plasticidade sináptica (TELES-GRILLO RUIVO; MELLOR, 2013).

Apesar de ser uma condição complexa e com múltiplas condições fisiopatológicas associadas, os marcadores clássicos da doença são a deposição de placas amiloides extracelulares, formadas pelo peptídeo amiloide beta 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ ), e a formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, formados pela proteína tau fosforilada (DETURE; DICKSON, 2019; JIANG, SHANGTONG *et al.*, 2014).

### **1.1.1. A forma esporádica da doença de Alzheimer**

A DA é caracterizada por duas formas, a forma esporádica e a forma familiar. A forma esporádica da doença é aquela que tem etiologia multifatorial (DORSZEWSKA *et al.*, 2016), apesar da idade de ser o principal fator de risco (NIU, 2017). Em 90 % dos casos esporádicos, a doença se manifesta de forma tardia, com maior prevalência em indivíduos com 65 anos ou mais (RABINOVICI, 2019). Há ainda um percentual menor de indivíduos (~ 10 %) que manifesta a DA esporádica de forma precoce, ou seja, com menos de 65 anos (RABINOVICI, 2019). A DA esporádica também é caracterizada por progressão mais lenta dos sinais e sintomas associados à doença (DETURE; DICKSON, 2019; MORRIS *et al.*, 2014).

Também é sabido que múltiplos fatores estão associados ao aumento de risco de desenvolvimento da forma esporádica da DA. Sabemos, por exemplo, que a doença é mais prevalente em mulheres do que em homens (NAZARIAN; YASHIN; KULMINSKI, 2019; NIU, 2017) e que indivíduos de origem afro-americana apresentam maior risco para essa condição do que aqueles de origem hispânica ou europeia (BABULAL *et al.*, 2019). O nível educacional também sido mostrado como importante fator de risco dessa doença (LEE, JUN YOUNG *et al.*, 2008; NITRINI *et al.*, 2009). Outros fatores associados são aqueles relacionados aos hábitos da vida diária, como o uso de tabaco, consumo de álcool, dieta e sedentarismo (BERTI *et al.*, 2018; CATALDO; PROCHASKA; GLANTZ, 2010; KIVIPELTO *et al.*, 2005; MATTHEWS *et al.*, 2014; WHITMER *et al.*, 2005; YAN *et al.*, 2020), além de outras condições patológicas como obesidade, diabetes e doenças vasculares (KIVIPELTO *et al.*, 2005; LEE, HEE JAE *et al.*, 2018; PENDLEBURY; ROTHWELL, 2009; PROFENNO; PORSTEINSSON; FARAONE, 2010). Fatores genéticos também estão associados a DA, tal como a presença da variação alélica  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E (*APOE*  $\epsilon 4$ ) (CORDER *et al.*, 1993; SAUNDERS *et al.*, 1993). Além disso, atualmente há 29 genes

sabidamente associados a causas esporádicas de DA e estima-se que esse número seja ainda maior (JANSEN *et al.*, 2019; KUNKLE *et al.*, 2019).

### **1.1.2. A forma familiar da doença de Alzheimer**

Há ainda um percentual menor dos casos de DA que é explicado por causa genética autossômica dominante, também conhecida como forma familiar (BERTRAM; TANZI, 2019; VAN CAUWENBERGHE; VAN BROECKHOVEN; SLEEGERS, 2016). A forma familiar está associada a mutações nos genes da proteína precursora amiloide (PPA) (GOATE *et al.*, 1991; ST. GEORGE-HYSLOP, PETER H. *et al.*, 1987), da presenilina 1 (PS1) (GEORGE-HYSLOP, P. ST *et al.*, 1992; SHERRINGTON *et al.*, 1995; VAN BROECKHOVEN *et al.*, 1992) e da presenilina 2 (PS2) (SHERRINGTON *et al.*, 1996; VAN GIAU *et al.*, 2019). Nesses casos, o surgimento dos sinais e sintomas da doença ocorrem precocemente, mais frequentemente a partir dos 44 anos de idade (SHEA *et al.*, 2016; VAN CAUWENBERGHE; VAN BROECKHOVEN; SLEEGERS, 2016). As formas autossômica dominante explicam entre 5 e 10 % dos casos de DA de início precoce (LANE; HARDY; SCHOTT, 2018; SHEA *et al.*, 2016). A possível participação das proteínas PPA, PS1 e PS2 no desenvolvimento de DA será evidenciada mais a frente nesta introdução.

Parte dos modelos animais transgênicos para a doença disponíveis para a realização de estudos experimentais e pré-clínicos mimetizam a forma familiar para DA. O modelo duplo transgênico APP/PS1, por exemplo e que é de interesse do presente trabalho, foi gerado para expressar a proteína PPA mutante humana e a presenilina 1 mutante (JANKOWSKY *et al.*, 2004; LI, HAO; WEI, 2015; LOK *et al.*, 2013). Ambas as alterações genéticas levam ao aumento da produção de A $\beta$ <sub>1-42</sub> e a deposição de placas amiloide. O modelo também apresenta comprometimento cognitivo e comportamental como fenótipo. Dessa forma, tais modelos são capazes de explicar parte das alterações associadas a fisiopatogênese por meio da hipótese conhecida como amiloide beta, uma das hipóteses mais bem aceitas para DA.

## **1.2. A hipótese amiloide para a patogênese da doença de Alzheimer**

Uma das hipóteses mais aceitas para DA é a hipótese amiloide, que sugere que DA tem sua patogênese baseada na produção e acúmulo exagerados do peptídeo

A $\beta$  e que culminam com comprometimento neuronal, sináptico e funcional (HARDY; SELKOE, 2002; SELKOE; HARDY, 2016). A $\beta$  são peptídeos produzidos a partir da PPA e suas funções normais estão envolvidas com transdução de sinais, alongamento axonal, adesão e migração celular, transporte de proteínas e sinaptogênese (BROTHERS; GOSZTYLA; ROBINSON, 2018; CHEN, GUO FANG *et al.*, 2017). As espécies de amiloide são produzidas a partir da quebra de PPA e segue, basicamente, duas vias: a) a clivagem por meio das enzimas  $\alpha$ -secretase e  $\gamma$ -secretase gera espécies  $\alpha$ -amiloide, menor em quantidade de aminoácidos e com menor capacidade de agregação; ou b) a quebra por meio das enzimas  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase gera espécies  $\beta$ -amiloide, maior em quantidade de aminoácidos e com maior capacidade de agregação (GRIMM *et al.*, 2013; JIANG, SHANGTONG *et al.*, 2014; MOKHTAR *et al.*, 2013; ROBINSON *et al.*, 2014) (Figura 1). Além do mais, peptídeos A $\beta$  podem ter, mais frequentemente, 40 ou 42 resíduos, sendo que o peptídeo 1-40 (A $\beta$ <sub>1-40</sub>) é o mais prevalente e o 1-42 (A $\beta$ <sub>1-42</sub>) é o mais neurotóxico. A  $\gamma$ -secretase possui como componentes catalíticos as PS1 e PS2 e é esse componente que determina o comprimento do A $\beta$  (PENKE; BOGÁR; F L, 2017). Por fim, as espécies de A $\beta$  tem alta capacidade de agregação, favorecendo a formação de oligômeros neurotóxicos e a deposição do peptídeo na forma de placas senis (JIANG, SHANGTONG *et al.*, 2014), o que pode desencadear comprometimento sináptico e cognitivo presentes na DA (O' NEILL, 2013).

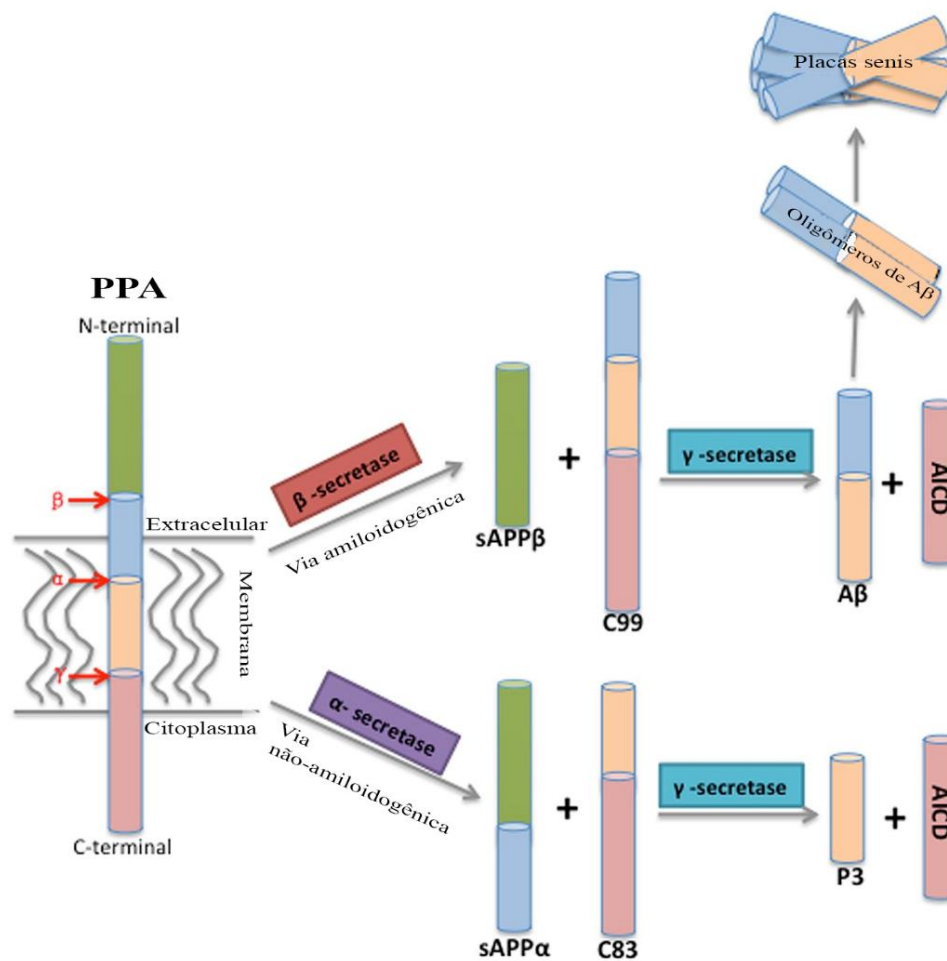


Figura 1: Clivagem da PPA. A clivagem de PPA pode seguir a via não-amiloidogênica ou a via amiloidogênica. A via não-amiloidogênica é aquela na qual PPA é clivada pela  $\alpha$ -secretase e depois por  $\gamma$ -secretase, gerando fragmentos  $\alpha$ -amiloides solúveis. Por outro lado, quando a PPA é clivada pela  $\beta$ -secretase e depois por  $\gamma$ -secretase, são gerados  $\beta$ -amiloides, que tem alta capacidade de agregação nas formas oligoméricas ou de placas senis insolúveis, via conhecida como amiloidogênica. Fonte: modificado de (SUN, XIAOJUAN; CHEN; WANG, 2015).

O aumento da produção de tal peptídeo pode induzir danos tanto no seu formato oligomérico, quanto na forma de fibrilas ou placas amiloide (LIN, WEI *et al.*, 2013; O' NEILL, 2013). Em seu formato oligomérico, A $\beta$  pode gerar consequências intracelulares mais relacionadas ao acúmulo em lisossomos, causando a perda de função desses últimos e alterações metabólicas que levam a morte neuronal (FRIEDRICH *et al.*, 2010; KRAFFT; KLEIN, 2010; PATEL, AARTI N.; JHAMANDAS, 2012). As placas extracelulares insolúveis de A $\beta$  também são tóxicas aos neurônios, além de gerarem resposta por micróglias (inflamação) e induzir a fosforilação da proteína tau, o que também leva à neurodegeneração (KADOWAKI *et al.*, 2005; SELKOE; HARDY, 2016; TAKUMA *et al.*, 2004).

Segundo a hipótese amiloide, a produção exagerada de A $\beta$  pode, ainda, levar a outros processos associados a doença, como a hiperfosforilação da proteína tau. Tau é uma fosfoproteína que, em condições fisiológicas, está localizada nos axônios e atua na estabilização dos microtúbulos. Na DA, ocorre a hiperfosforilação da tau, o que acarreta a formação de inclusões nos corpos celulares e processos dendríticos, aos quais a proteína se agrega e acumula na forma de filamentos helicoidais pareados, formando os emaranhados neurofibrilares. Isso contribui para a despolimerização dos microtúbulos, rompimento do citoesqueleto axonal e morte celular (MOKHTAR *et al.*, 2013). O comprometimento sináptico pode ser observado, por exemplo, pela diminuição na concentração de sinaptofisina, uma proteína de vesículas pré-sinápticas (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

### **1.3. Excitotoxicidade e doença de Alzheimer**

Um outro aspecto básico envolvido em DA é a excitotoxicidade (ESPOSITO *et al.*, 2013; LEWERENZ; MAHER, 2015; LIU, JINPING *et al.*, 2019), uma condição na qual há dano neuronal induzido pela exagerada sinalização mediada por glutamato (VELASCO *et al.*, 2017). Tal processo patológico é primariamente induzido pela entrada de altos níveis de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) na célula, causada pela ativação exacerbada de receptores para o neurotransmissor excitatório glutamato, como os receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (KRITIS *et al.*, 2015; VELASCO *et al.*, 2017; WANG, YAN; QIN, 2010) (Figura 2). A quebra da homeostase iônica e o excesso de entrada de Ca<sup>2+</sup> leva à disfunção mitocondrial (PIVOVAROVA, NATALIA B.; ANDREWS, 2012), com alteração do potencial de membrana mitocondrial, danos na matriz e na cadeia respiratória e consequente redução da fosforilação oxidativa, o que tem como consequência a redução da produção de adenosina trifosfato (ATP) e aumento da produção de radicais livres, seguido da liberação de fatores apoptóticos (BERNARDI *et al.*, 2006; BUDD *et al.*, 2000; RAO, V K; CARLSON; YAN, 2014) (Figura 2). Esse processo parece ser irreversível em neurônios (PIVOVAROVA, N. B., 2004), o que leva a perda de funções e que, portanto, merece grande atenção.

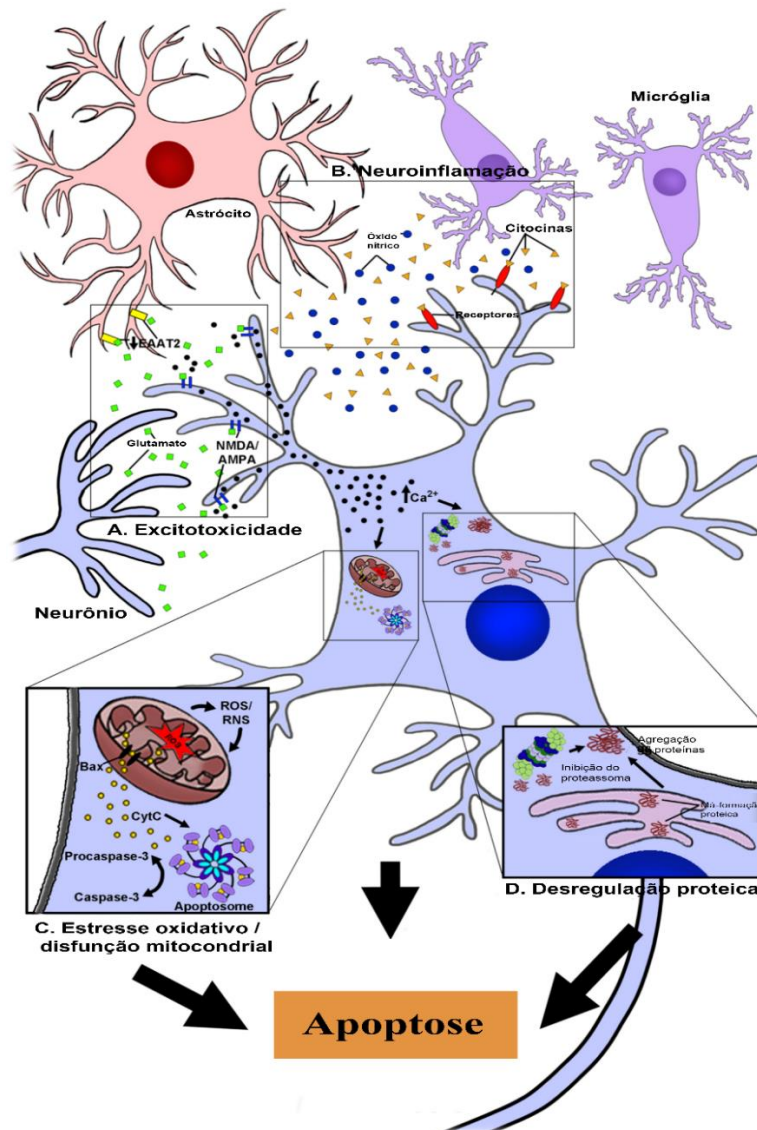


Figura 2: Mecanismos que contribuem para a patogênese de DA. A. Níveis alterados de glutamato podem levar a estimulação exacerbada dos receptores do tipo NMDA, causando influxo exagerado de  $Ca^{2+}$  e, conseqüentemente, disfunção mitocondrial, disfunção no retículo endoplasmático e apoptose. B. A neuroinflamação é um dos aspectos envolvidos na DA, podendo contribuir para a degeneração neuronal. C. Alterações na atividade da mitocôndria podem levar a comprometimento da cadeia respiratória, estresse oxidativo, redução da produção de ATP e ativação de fatores apoptóticos. D. Alterações no processo de produção de proteínas pode levar à produção de proteínas malformadas, ao acúmulo na forma de agregados e ativação de vias apoptóticas. Fonte: modificado de (WINTER; BICKFORD, 2019).

Nesse sentido, a superprodução de  $A\beta$  pode contribuir para a ativação exacerbada de receptores do tipo NMDA e favorecer o processo excitotóxico observado em DA (ESPOSITO *et al.*, 2013; FINDLEY *et al.*, 2019; TEXIDÓ *et al.*, 2011; TU *et al.*, 2014; WANG, ZHI CONG; ZHAO; LI, 2013).  $A\beta$  é capaz de se ligar aos receptores do tipo NMDA e induzir aumento da entrada de  $Ca^{2+}$  na célula. A alteração

iônica intracelular gerada leva à ativação de vias pró-apoptóticas, à redução da produção de proteínas sinápticas e à desregulação na sinalização por neurotransmissores, que em conjunto contribuem para o dano neuronal e sináptico (LIU, JINPING; GAO; WU, 2008; MATTSON *et al.*, 1992; PANZA *et al.*, 2019; ZÁDORI *et al.*, 2018).

Adicionalmente, a super expressão de tau leva ao aumento do processo excitotóxico induzido por glutamato (DECKER *et al.*, 2016; MAEDA *et al.*, 2016) e, por outro lado, a inibição de tau reduz essas consequências (ITTNER *et al.*, 2010; ROBERSON *et al.*, 2007). Somado a isso, a ativação de receptores NMDA extrassinápticos leva ao aumento da fosforilação por tau (SUN, XU YING *et al.*, 2016), num processo que parece contínuo e prolongado que leva à morte neuronal. Seja pelo efeito de A $\beta$ , tau ou outros fatores, a ativação excessiva desses receptores pode levar à perda neuronal e contribuir para o desenvolvimento e progressão de DA (WANG, RUI; REDDY, 2017a). Por fim, alguns trabalhos já mostraram que os níveis de liberação de glutamato estão alterados em DA, de modo que a liberação exagerada desse neurotransmissor pode levar a superativação dos receptores do tipo NMDA, o que também culmina em excitotoxicidade (DANYSZ; PARSONS, 2003; LIU, JINPING; GAO; WU, 2008).

#### **1.4. Morte celular na doença de Alzheimer**

Todos esses processos podem contribuir para a morte de neurônios e outras células do sistema nervoso central (SNC), levando à perda de função. De acordo com o Comitê de Morte Celular 2018, há 12 tipos diferentes de morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2018), sendo que os 3 principais tipos são apoptose, necrose e morte autofágica. Esses mecanismos são fundamentais para a manutenção da homeostase tecidual, no entanto, a desregulação desses processos é altamente danosa e contribuem para uma série de patologias, incluindo DA (FRICKER *et al.*, 2018; OBULESU; LAKSHMI, 2014; UDDIN *et al.*, 2018). Nesse sentido, já foi mostrada a presença de DNA danificado e a ativação das caspases em tecidos de pacientes com DA, indicativos de processo apoptótico (MIGHELI *et al.*, 1994; SELZNICK *et al.*, 1999; SU *et al.*, 2001). Tem-se sugerido que A $\beta$  poderia levar a ativação de formas de caspase, levando a apoptose (EIMER; VASSAR, 2013; GLABE, 2001; HAN *et al.*, 2017; LUSTBADER *et al.*, 2004; ODDO *et al.*, 2003). Demonstrou-se, também, que a



clivagem de tau parece ser dependente da ativação de caspase-9 (ROHN *et al.*, 2002). Além disso, um estudo mostrou que a caspase-3 tem um papel importante no mecanismo de comprometimento sináptico encontrado em DA, sendo que a inibição farmacológica dessa caspase reduziu a patologia em um modelo animal de DA (D'AMELIO *et al.*, 2011).

Ainda nesse sentido, o processo excitotóxico mediado pela interação de A $\beta$  e os receptores do tipo NMDA, já mencionada anteriormente nessa introdução, também contribui para morte neuronal e de outras células do SNC. Sabe-se que o funcionamento adequado dos receptores do tipo NMDA está amplamente associado a diversos processos plásticos no cérebro (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013; REBOLA; SRIKUMAR; MULLE, 2010). No entanto, sinalização inadequada via NMDA tem como consequência disfunção sináptica, além da ativação de vias pró-apoptóticas e a inibição de vias pró-sobrevivência, culminando com morte neuronal e perda de função (LIU, JINPING; GAO; WU, 2008; LIU, YITAO *et al.*, 2007; ROSELLI *et al.*, 2005; ZHOU, QIANG; SHENG, 2013). A ativação de receptores NMDA extrassinápticos, por exemplo, leva ativação da via das caspases após estímulo com A $\beta$ , sugerindo um processo apoptótico. Além disso, como já mencionado anteriormente, o desbalanço iônico intracelular gerado excesso de entrada de Ca<sup>2+</sup> induz alterações mitocondriais, com consequente redução da fosforilação oxidativa e redução da produção de ATP e aumento da produção de radicais livres e de fatores apoptóticos (BERNARDI *et al.*, 2006; BUDD *et al.*, 2000; RAO, V K; CARLSON; YAN, 2014).

Há muito se sabe que alterações em mecanismos de autofagia estão presentes na DA (RA *et al.*, 2005; RUBINSZTEIN *et al.*, 2005; SON, JIN H *et al.*, 2012). Estudos com modelos experimentais também têm mostrado que há deficiência em tais mecanismos e que isso pode estar relacionado à fisiopatologia da doença (BELINSON *et al.*, 2008; CHO *et al.*, 2015; LEE, JONG KIL *et al.*, 2014; TELEGINA *et al.*, 2019). Alterações nesses processos poderiam estar relacionadas à eliminação deficitária de formas tóxicas de A $\beta$  e tau, já que a autofagia facilita a eliminação desses peptídeos, especialmente A $\beta$  (SON, SUNG MIN *et al.*, 2012; SUN, MIAO; ASGHAR; ZHANG, 2016). Também é possível haver produção de formas amiloides em autofagossomos (HAUNG YU *et al.*, 2005; MIZUSHIMA, 2005) e, portanto, a presença de vesículas malformadas ou imaturas poderia ser fonte de produção desses peptídeos. Mais do que isso, falhas em mecanismo de autofagia também podem levar a redução da

eliminação de A $\beta$  da célula e ao acúmulo desse peptídeo no meio intracelular (NILSSON *et al.*, 2015; NILSSON; SAIDO, 2014). Por fim, mecanismos de autofagia também estão relacionados a degradação de tau (CONGDON *et al.*, 2012; HAMANO *et al.*, 2008; INOUE *et al.*, 2012) e a deficiência nesse processo também pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de DA.

### **1.5. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer**

Quanto ao tratamento da DA, de acordo com *National Institute on Aging (National Institutes of Health - NIH)*, atualmente a intervenção farmacológica para os sintomas comportamentais e alterações das funções diárias é realizado com os inibidores reversíveis das colinesterases, tais como donepezila, rivastigmina e galantamina, e/ou com memantina, um antagonista não competitivo do receptor de glutamato do tipo NMDA. No entanto, em estágios avançados da DA, esses fármacos possuem poucos efeitos sobre a memória, a cognição e os comportamentos diários (TELL; HILGEROTH, 2013).

Considerando o comprometimento no sistema colinérgico observado em DA e sabendo que a ACh tem participação fundamental em processos de aprendizado, memória, atenção e plasticidade sináptica (TELES-GRILLO RUIVO; MELLOR, 2013), a inibição das colinesterases é uma das primeiras estratégias farmacológicas utilizadas. A utilização de anticolinesterásicos tem como resultado o aumento da disponibilidade de ACh na fenda sináptica e atua melhorando alguns sintomas associados à doença, especialmente aqueles relacionados à memória e atenção (COLOVIC *et al.*, 2013; DOU *et al.*, 2018; GEERTS; GROSSBERG, 2006).

Também é sabido que ocorre um aumento da produção de glutamato em DA, levando ao aumento da ativação de receptores para glutamato do tipo NMDA, resultando em sinalização disfuncional por glutamato e, em última análise, em comprometimento da memória e de outras funções cognitivas (CONWAY, 2020; WANG, RUI; REDDY, 2017b). Nesse sentido, a memantina, um antagonista do receptor do tipo NMDA, atua reduzindo as consequências causadas pela sinalização alterada de glutamato mediada pelo receptor do tipo NMDA (GEERTS; GROSSBERG, 2006; PARSONS *et al.*, 2013). A memantina pode ser usada em associação com os anticolinesterásicos em casos moderados e graves de DA (DOU *et al.*, 2018;

FARRIMOND; ROBERTS; MCSHANE, 2012; MATSUNAGA; KISHI; IWATA, 2015; TAN, 2014; TSOI *et al.*, 2016).

Além das drogas supracitadas, podem ser utilizados antidepressivos ou antipsicóticos no tratamento de sintomas psiquiátricos comportamentais que, em geral, aparecem na fase intermediária da doença (ROBERSON; MUCKE, 2006). Apesar disso, nenhuma das drogas usadas atualmente interrompe a progressão da doença. Desta forma, existe a necessidade de entender melhor a fisiopatologia do Alzheimer e desenvolver tratamentos que possam interromper ou reverter a progressão da doença. Nesse sentido, outros alvos farmacológicos estão sendo evidenciados nos últimos anos, sendo que os componentes da resposta imune são de especial interesse no presente trabalho.

#### **1.6. O papel da resposta imune na doença de Alzheimer**

Inflamação e neuroinflamação são consideradas fatores etiológico de desordens neurológicas e neurodegenerativas (GILHUS; DEUSCHL, 2019; KEMPURAJ, D *et al.*, 2016; KEMPURAJ, DURAISAMY *et al.*, 2017) e são importantes fenômenos que ocorrem na DA (WANG, WEN YING *et al.*, 2015; WYSS-CORAY; MUCKE, 2002). Em pacientes com DA, já foi demonstrado que há um aumento na produção basal de citocinas por células mononucleares periféricas, em comparação com indivíduos idosos sem diagnóstico de DA (ROCHA *et al.*, 2012; ZENARO *et al.*, 2015). Além disso, Shad e colaboradores (2013) observaram que o número de monócitos em pacientes com DA está elevado, independentemente de sexo e idade. Em pacientes com números normais de monócitos, os níveis de leucócitos são elevados, ao contrário dos de linfócitos e basófilos, que estão reduzidos (SHAD *et al.*, 2013). Essas observações evidenciam que o processo inflamatório, assim como sua modulação, são processos fundamentais para a compreensão da doença.

Já no sistema nervoso central, a resposta imunológica e a inflamação são, inicialmente, mediadas por diferentes células da glia, em especial pela micróglia (MORIMOTO; NAKAJIMA, 2019; RANSOHOFF; BROWN, 2012). Esse conjunto de macrófagos especializados é o componente celular mais importante para a resposta imunológica no cérebro e, em condições de agressão ao SNC, migram para as regiões lesadas e podem proliferar, liberar mediadores inflamatórios e imunorreguladores,

exercer atividade fagocítica e produzir fatores neurotróficos (STREIT *et al.*, 2014; STREIT, 2002; WOLF; BODDEKE; KETTENMANN, 2017). Além disso, essas células possuem inúmeras outras funções no SNC, como a manutenção da homeostase tecidual, da integridade e plasticidade neuronal e plasticidade e sincronização sináptica (AKIYOSHI *et al.*, 2018; LEE, EUNBEOL; CHUNG, 2019; WEINHARD *et al.*, 2018).

A micróglia pode ter papel protetor, especialmente nas fases iniciais da doença, mas com o progresso da doença essa célula parece assumir um estado de ativação sustentado e tem parte de suas funções comprometidas, o que parece que contribui para a fisiopatologia de DA (EDISON *et al.*, 2008; FROST; JONAS; LI, 2019; NOVELLINO *et al.*, 2020). Existem evidências de que a micróglia remove e degrada o A $\beta$ , reduzindo assim a sua deposição extracelular (KRABBE *et al.*, 2013). Porém, essas células reduzem, no decorrer da doença, a expressão de receptores que se ligam ao A $\beta$ , bem como a produção das enzimas que degradam o peptídeo, mas não perdem a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que, por sua vez, além de serem neurotóxicas, também estimulam a formação do A $\beta$  (HICKMAN; ALLISON; EL KHOURY, 2008a). Além disso, o próprio A $\beta$  ativa a micróglia e induz a produção e liberação de mediadores neurotóxicos (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007). Também sabemos que há uma importante sinalização em via de mão dupla entre o encéfalo e a periferia, de modo que mediadores inflamatórios [ex. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10)] produzidos na periferia podem cruzar a barreira hematoencefálica (BHE) (AMOR; NICOLA, 2014). Também sabemos que macrófagos presentes nas meninges pode atuar na resposta no CNS e que células periféricas podem adentrar o SNC e patrulhar o parênquima cerebral em condições patológicas ou não patológicas (BROCHARD *et al.*, 2009; ENGELHARDT; RANSOHOFF, 2005; GOLDMANN *et al.*, 2016; HICKEY; HSU; KIMURA, 1991; PRINZ; PRILLER, 2017; RANSOHOFF; ENGELHARDT, 2012; XU *et al.*, 2010) (Figura 3).

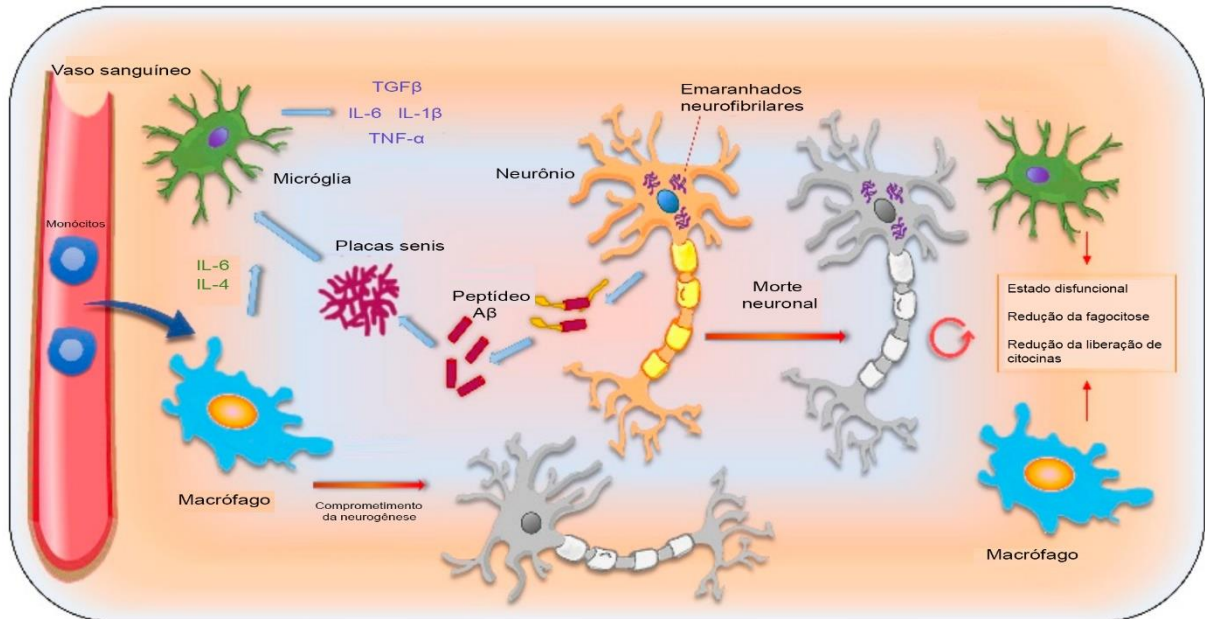


Figura 3: Papel da resposta imune na patogênese de DA. No cérebro, a aglomeração e deposição de A $\beta$  podem induzir resposta a resposta imunológica, com ativação microglial e produção de uma série de mediadores inflamatórios. Além disso, células e mediadores inflamatórios vindos da periferia podem atravessar a BHE e contribuir para o desenvolvimento e progressão de DA. Fonte: modificado de (NOVELLINO *et al.*, 2020).

Entendendo o papel importante da resposta imune e da inflamação em processos neurodegenerativos e, mais especificamente, em DA, a questão-chave aqui é a seguinte: a modulação da resposta imunológica ou inflamatória poderia atenuar o progresso da doença? Nesse sentido, os imunossuppressores emergem como uma proposta terapêutica interessante. A hipótese por trás da proposta é que a resposta inflamatória no SNC, mediada principalmente pela micróglia, pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de DA, de modo que a imunossupressão poderia reduzir tal reação e interromper parte dos processos associados à progressão da doença. Exemplos de imunossuppressores são os anticorpos, como anti-TNF- $\alpha$ , os inibidores da via de mTOR, como a rapamicina e o tensiolimo, e os inibidores da calcineurina, tais como a ciclosporina e o tacrolimo, além de outros imunossuppressores.

### 1.7. O potencial uso de imunossuppressores para o tratamento da doença de Alzheimer

Considerando que diferentes células do sistema imune, tais como micróglia e células periféricas, poderiam contribuir para o desenvolvimento de DA, torna-se importante investigar o efeito da inibição de suas funções ou a modulação de tais

células nesta condição. De fato, estudos recentes demonstraram efeitos neuroprotetores de imunossupressores em DA.

O fingolimode, um fármaco que regula negativamente o receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR) e que inibe a saída dos linfócitos dos órgãos linfoides, originalmente utilizado para tratamento de esclerose múltipla (CHUN; HARTUNG, 2010; KAPPOS *et al.*, 2010; KREMENCHUTZKY *et al.*, 2014), tem sido testado em modelos de DA. O tratamento com fingolimode teve efeito neuroprotetor no modelo de injeção de A $\beta$ , com redução do dano cognitivo induzido pelo peptídeo associado ao aumento da expressão e liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em indivíduos tratados (DOI *et al.*, 2013). Estudos que utilizaram modelos transgênicos também mostraram efeitos positivos do fingolimode sobre o desempenho cognitivo, com redução dos níveis de A $\beta$  no cérebro de animais tratados (ASLE-ROUSTA *et al.*, 2013; FUKUMOTO *et al.*, 2014; HEMMATI *et al.*, 2013; TAKASUGI *et al.*, 2013). Além disso, o impacto do tratamento com esse imunossupressor sobre o desempenho cognitivo e níveis de A $\beta$  também parecem estar associados a menor expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e TNF- $\alpha$  (ASLE-ROUSTA *et al.*, 2013) e a redução da microgliose e da astrogliose no hipocampo de animais transgênicos (AYTAN *et al.*, 2016; JOSHI *et al.*, 2017).

A rapamicina, um imunossupressor inibidor de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (DUMONT; SU, 1995), também tem sido investigado como possível droga protetora na DA em modelos experimentais. A redução da atividade de mTOR tem pelo tratamento crônico com rapamicina reduziu a progressão do comprometimento cognitivo e o acúmulo de placas A $\beta$  em modelo murino de DA (CACCAMO *et al.*, 2010; SPILMAN *et al.*, 2010). Além disso, a mesma tem efeito positivo sobre o comprometimento vascular e da BHE (LIN, AI LING *et al.*, 2013, 2017; VAN SKIKE *et al.*, 2018) e reverte a degradação da ultraestrutura sináptica (CACCAMO *et al.*, 2014; SPILMAN *et al.*, 2010) encontrados nos modelos de DA. O temsirolimus, um análogo de rapamicina, levou a redução da fosforilação de proteína tau no cérebro de animais transgênicos tratados (FREDERICK *et al.*, 2015; JIANG, TENG *et al.*, 2014; OZCELIK *et al.*, 2013), além de proteger contra a neurodegeneração, perda axonal e sináptica e gliose reativa no córtex entorrinal induzidas por tau (SIMAN; COCCA; DONG, 2015).

A modulação de TNF- $\alpha$  também tem sido uma estratégia para a imunossupressão utilizada recentemente em modelos de doenças neurodegenerativas. Níveis alterados de TNF- $\alpha$  induzidos pela injeção de A $\beta$  ou encontrados em animais transgênicos de DA foram revertidos por moduladores desse mediador inflamatório (ALKAM *et al.*, 2008; DETRAIT *et al.*, 2014; GABBITA *et al.*, 2012; RYU, JAE K.; MCLARNON, 2008; SHI *et al.*, 2011). Além do mais, alguns estudos observaram que o tratamento com moduladores de TNF- $\alpha$  reduziu os níveis de A $\beta$  solúvel e do número de placas A $\beta$  (HE *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2011; TWEEDIE *et al.*, 2012) e a protegeu contra o comprometimento cognitivo e perda sináptica induzidos por injeção de A $\beta$  ou observado em animais transgênicos (ALKAM *et al.*, 2008; DETRAIT *et al.*, 2014; GABBITA *et al.*, 2012; PAOURI *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2011; TWEEDIE *et al.*, 2012). Com relação aos efeitos sobre os marcadores inflamatórios, observou-se atenuação da microgliose e astrogliose no hipocampo e no córtex de animais tratados (GABBITA *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2013; PAOURI *et al.*, 2017; RUSSO *et al.*, 2012). Um pequeno estudo clínico demonstrou que o etanercept, um agente biológico anti-TNF, também usado para as doenças autoimune supracitadas, melhora a cognição de pacientes com DA nas fases moderada a tardia (TOBINICK; GROSS, 2008).

Sabendo do potencial do uso de imunomoduladores para o tratamento de DA, uma importante classe de imunossupressores usada na clínica é a dos inibidores de calcineurina (ICN), uma proteína que tem papel importante na modulação de uma série de processos fisiológicos e patológicos, como resposta imune, desenvolvimento e viabilidade celular, controle de influxo de Ca<sup>2+</sup>, dentre outros (KIPANYULA; KIMARO; ETET, 2016).

### **1.7.1. Os inibidores da calcineurina**

A calcineurina (CN) é uma proteína fosfatase serina/treonina dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaM) que é expressa em quase todos os tipos celulares, incluindo o tecido cerebral (GOTO *et al.*, 1986; REESE; TAGLIALATELA, 2010; RUSNAK; MERTZ, 2000). Esta proteína é um heterodímero composto, estruturalmente, pelas seguintes subunidades: uma maior, de 60 KDa e de função catalítica, e uma menor, de 19 KDa e de função regulatória. A subunidade maior, chamada CNA, possui quatro

domínios, um domínio com atividade fosfatase, o qual se liga à subunidade menor, chamada CNB; um terceiro que se liga ao  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ; e, por fim, um quarto domínio, que tem função autoinibitória e suprime a atividade catalítica de CNA quando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  estão reduzidos. A subunidade B contém 4 sítios de ligação para  $\text{Ca}^{2+}$  e está, geralmente, fisicamente ligada a CNA quando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  estão adequados. Existe uma interação alostérica entre CNB,  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  e a subunidade autoinibitória que permite que a CN responda de forma rápida a qualquer flutuação nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no microambiente (KLEE; REN; WANG, 1998; STEMMER; KLEE, 1994).

Dentro da célula, a CN pode ser encontrada tanto no citosol quanto no núcleo, e ainda pode ser encontrada em associação com receptores de membrana, canais iônicos e bombas, por meio de interações físicas com uma série de proteínas de ancoragem (MUSSON; SMIT, 2011; RUSNAK; MERTZ, 2000). Sua atividade pode ser ativada por CaM e atua controlando a flutuação de  $\text{Ca}^{2+}$  no tecido. Tais funções estão relacionadas a um conjunto de respostas, que incluem a resposta imune, formação e modelação dos músculos, além de ter importante participação na formação e integridade sináptica, na plasticidade neuronal e na morte celular (ALZUHERRI; CHANG, 2003; ASAI *et al.*, 1999; BITO; DEISSEROTH; TSIEN, 1996; CAVALLUCCI; BERRETTA, 2013; CLIPSTONE; CRABTREE, 1992; MANSUY, 2012).

Nesse conjunto de funções, sua atuação sobre a resposta imune, através da sua ativação em potencial do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (LUO, C *et al.*, 1996; MACIAN, 2005), merece grande atenção (Figura 4). Há muito se sabe que NFAT é um fator de transcrição amplamente envolvido na transcrição de vários genes de citocinas como por exemplo a interleucina 1 (IL-2), interleucina 4 (IL-4),  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  (GUO *et al.*, 2008; MACIAN, 2005; RAO, A; LUO; HOGAN, 1997; SHAW *et al.*, 1995). Quando a CN é ativada por meio de sinais dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , esta desfosforila o NFAT citosólico, levando a translocação deste para o núcleo, onde atua de forma cooperativa com outros fatores, como a proteína ativadora 1 (AP-1), o fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) e o fator estimulador de miócitos 2 (MEF-2) (ALZUHERRI; CHANG, 2003; DE LA FUENTE *et al.*, 2014; KARIN; TIAN, 1999; NINOMIYA-TSUJI *et al.*, 1999).



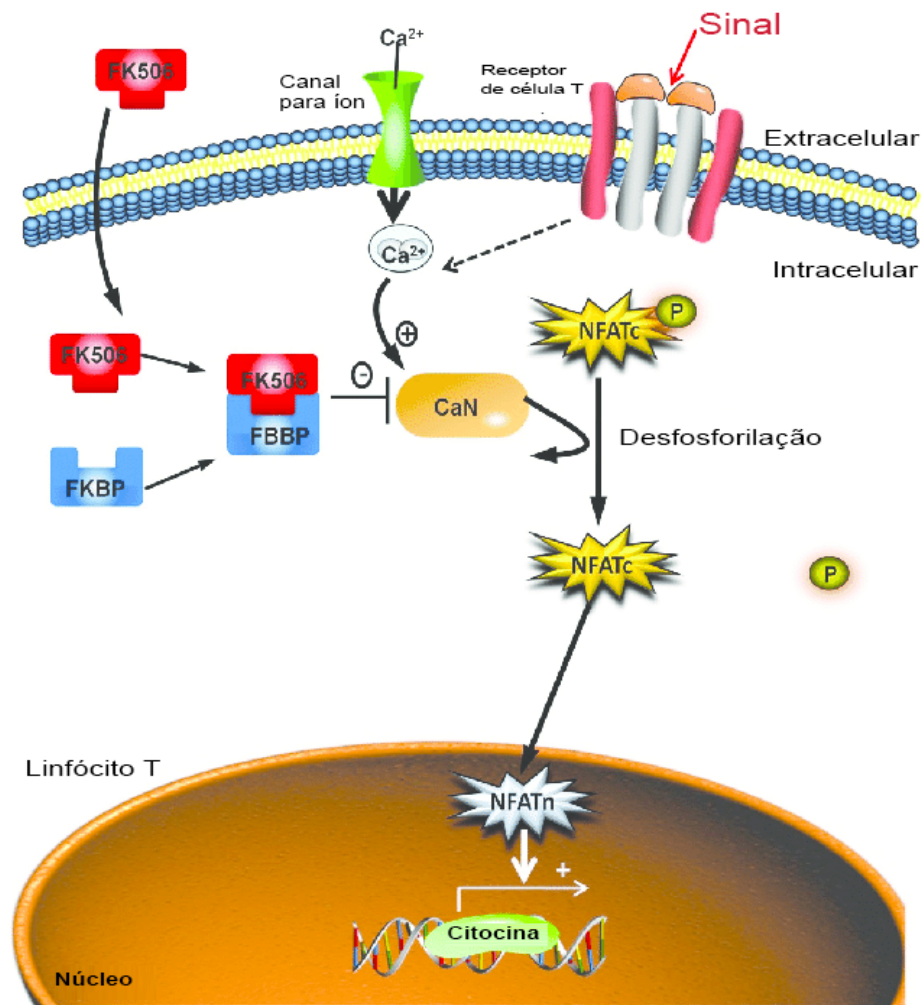


Figura 4: Via ativação da calcineurina e estratégica farmacológica de inibição de sua atividade. A calcineurina (CN) é uma proteína dependente de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de modo que, com aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , essa proteína é ativada e pode atuar na desfosforilação de NFAT. A desfosforilação de NFAT induz sua migração para o núcleo da célula, onde atua na transcrição de citocinas. O FK506 atua inibindo a calcineurina e, conseqüentemente, NFAT. Devido ao seu mecanismo de ação, esse fármaco é considerado um imunossupressor. Fonte: modificado de (BENNETT *et al.*, 2016).

Dentre as drogas ICN, as principais são ciclosporina A (CsA) e o tacrolimo (FK506), que apesar de diferentes em estrutura, possuem mecanismos celulares de ação semelhantes e são amplamente utilizados na clínica (EL-BATAWY *et al.*, 2009; TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005).

A CsA é uma droga amplamente utilizada em transplantes para evitar a rejeição de órgãos, tanto de órgãos sólidos quanto de medula óssea. A CsA interage com a imunofilina chamada ciclofilina A (CyPA) e então o complexo CsA-CyPA inibe a atividade fosfatase da CN (KE; HUAI, 2003). Esse complexo inibe a translocação de NFAT para o núcleo, com conseqüente inibição da produção de citocinas e ativação

de linfócitos T. Assim, esta droga induz um efeito imunossupressor. A CsA também atua em outros tipos celulares, como as células B, inibindo sua proliferação e induzindo apoptose. A CsA atualmente é usada na clínica para o tratamento da artrite reumatoide e psoríase e para a prevenção da rejeição após transplantes (COLOMBO; AMMIRATI, 2011). Por outro lado, o FK506 é um fármaco imunossupressor também muito utilizado em pacientes transplantados. Seus efeitos no sistema imune são bem caracterizados e estão relacionados à sua ligação à proteína imunofilina FKBP12, formando o complexo FK506-FKBP12. Seu mecanismo de ação é semelhante ao de CsA. De fato, o complexo FK506-FKBP12 inibe a ação da CN, inibindo assim a ativação de linfócitos T (LIU, J *et al.*, 1991) (Figura 4).

### **1.8. O potencial uso terapêutico dos inibidores da calcineurina na doença de Alzheimer**

A disfunção da CN em processos patológicos no cérebro é uma das maiores causas de doenças associadas a sinalização mediada por  $Ca^{2+}$ , tendo como consequências desordens cognitivas e, possivelmente, DA (MOHMMAD ABDUL *et al.*, 2011; TAGLIALATELA, 2011; WOODS; PADMANABHAN, 2012). Alguns trabalhos demonstram que a CN pode estar envolvida nas alterações patológicas observadas na DA. Sabe-se que certas espécies de  $A\beta$  são capazes de superativar a CN, desregulando a transcrição de genes e a atividade de canais iônicos, o que pode reduzir a integridade sináptica e induzir morte celular (CHEN, QI-SHENG *et al.*, 2002; DINELEY *et al.*, 2010; REESE *et al.*, 2008; REESE; TAGLIALATELA, 2010). Além disso, oligômeros de  $A\beta$  podem estimular NFAT em astrócitos, o que diminui a captação de glutamato e aumenta a degeneração neuronal (ABDUL *et al.*, 2009b). Por outro lado, apesar de não ser bem estabelecido, existem evidências de que a CN pode contribuir para a desfosforilação da proteína tau (RAHMAN; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 2006; WANG, JIAN-ZHI; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 2007) (Figura 5).

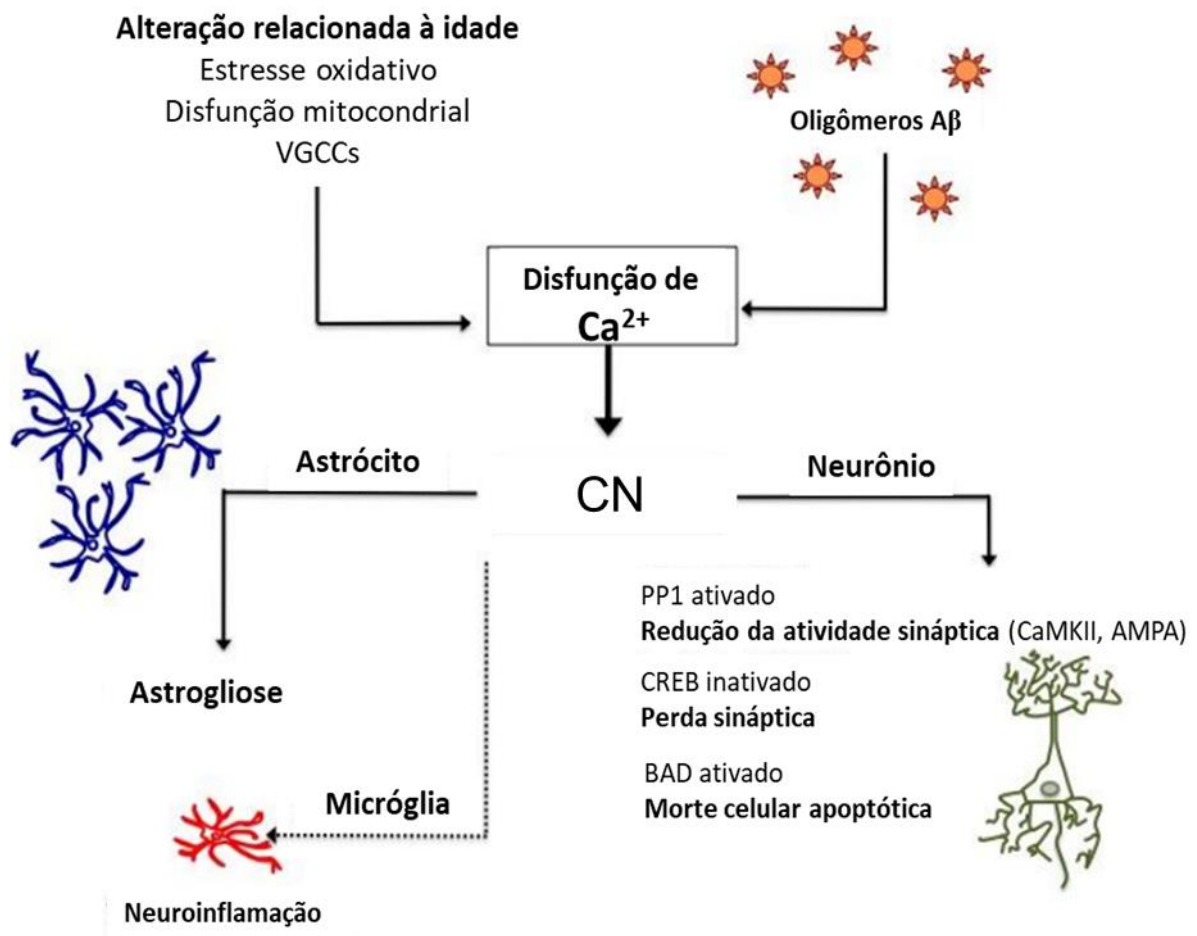


Figura 5: A alteração da atividade da calcineurina está associada a DA. Eventos associados ao envelhecimento ou a doenças neurodegenerativas são capazes de alterar a atividade da calcineurina (CN), o que tem impacto sobre a função de micróglia, astrócitos e neurônios. Fonte: Modificado de (REESE; TAGLIALATELA, 2010).

Diferentes estudos também têm mostrado o aumento da atividade de CN e da produção dessa proteína em modelos transgênicos para DA e em modelos de injeção intracerebral de Aβ (DINELEY *et al.*, 2007; HONG *et al.*, 2010; ROJANATHAMMANEE *et al.*, 2015; TAGLIALATELA *et al.*, 2010), corroborando com os dados encontrados em humanos e evidenciando os modelos animais como adequados para avaliar o possível papel dessa proteína em DA. Os dados obtidos a partir de pacientes e aqueles encontrados em modelos animais para DA sugerem que a CN é uma molécula-chave para o desenvolvimento de DA ou, pelo menos, para a progressão da mesma, indicando que a compreensão do papel dessa proteína na fisiopatologia da doença pode ser peça importante para a busca de um novo tratamento.

Sabendo-se que os níveis de CN no cérebro de pacientes com DA é aumentado (ABDUL *et al.*, 2009a; REESE *et al.*, 2011; REESE; TAGLIALATELA, 2011) e

considerando que essa fosfatase pode ter participação na progressão de tal doença, é razoável sugerir que o seu bloqueio possa reduzir os sinais da DA. Ademais, considerando que a inibição da atividade da CN é a estratégia terapêutica mais eficiente para suprimir a ativação de células T CD4+ e CD8+ e que essa fosfatase também atua de forma importante nas células de função imune no SNC (FURMAN; NORRIS, 2014), os ICN emergem como potenciais fármacos terapêuticos para DA.

Especialmente o FK506 tem mostrado resultados interessantes em modelos animais e ensaios em coorte. A primeira evidência que relacionou a calcineurina a DA foram apresentados por Dineley e colaboradores (2007). Os autores notaram um aumento da atividade de CN no hipocampo, córtex e cerebelo de animais transgênicos Tg2576 de 5 meses de idade, associado déficit de memória avaliado pelo paradigma do medo condicionado (DINELEY *et al.*, 2007). Resultados similares foram reportados em um modelo de injeção intracerebroventricular (ICV) de oligômeros A $\beta$  (DINELEY *et al.*, 2010). O tratamento agudo com FK506 (10 mg/kg) foi capaz de reverter o aumento da atividade de CN e déficit cognitivo encontrados tanto no modelo transgênico quanto no modelo de injeção de A $\beta$ . Além disso, o tratamento agudo com FK506 também foi capaz de reverter o comprometimento da memória de médio e longo prazo avaliada pela tarefa de reconhecimento de objetos em animais Tg2576 (TAGLIALATELA *et al.*, 2010).

Estudos envolvendo tratamento crônico são ainda mais raros. Um estudo utilizando indivíduos APP/PS1 de 8 meses de idade, conduziu um tratamento de 2 meses com FK506 e observaram a redução do acúmulo de placas A $\beta$  no córtex e no hipocampo (HONG *et al.*, 2010). Os efeitos estavam associados ao aumento dos níveis proteína metaloproteinase-9 (MMP-9) colocalizada com astrócitos GFAP-positivos, além da restauração dos níveis das proteínas sinápticas sinaptofisina e proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD-95) no cérebro de animais tratados com 5 mg/kg. A redução no acúmulo de placas de A $\beta$  também foi notada por Rojanathamane e colaboradores (2015) em um trabalho no qual indivíduos transgênicos APP/PS1 foram tratados por 28 dias com FK506 (1 mg/kg). Os autores perceberam que o tratamento atenuou o microgliose encontrada no hipocampo de animais transgênicos, apesar de não ter revertido os danos cognitivos (ROJANATHAMMANEE *et al.*, 2015). Por fim, o tratamento por 1 semana com a dose 10 mg/kg de FK506 foi capaz de reverter a redução da densidade de espinhos em

neurônios que estavam próximos a placas de A $\beta$  em animais APP/PS1 (ROZKALNE; HYMAN; SPIRES-JONES, 2011), reforçando o papel positivo dos ICN em modelos de DA.

Em único trabalho forneceu informações acerca dos impactos dos ICN em humanos. O estudo retrospectivo notou menor incidência de DA em que indivíduos submetidos a diversos tipos de transplante e que recebiam tratamento com FK506 para evitar rejeição de órgão (TAGLIALATELA; RASTELLINI; CICALESE, 2015). Apesar do dado interessante, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos dos inibidores da calcineurina em pacientes.

Os resultados obtidos até o momento por diferentes grupos mostram um promissor uso dos ICN em DA, no entanto, diferentes questões complexas ainda não estão elucidadas. A ativação ou supressão de vias de sobrevivência e morte celular associadas às diferentes condições fisiopatológicas da doença, como por exemplo a excitotoxicidade, ainda são pouco elucidadas, assim como a participação de CN nesses processos. Além do mais, o efeito da droga sobre a resposta imune crônica associada à DA foi pouco investigado. Porém, como descrito anteriormente, a DA é uma doença crônica e que apresenta uma patogênese complexa e lenta, de modo que um possível tratamento com essas drogas deveria ocorrer de forma prolongada. De forma complementar, deve-se enfatizar que, no caso do trabalho de Tagliatela e colaboradores (2015), foi avaliada a incidência de DA em pacientes tratados com o FK506 que foram submetidos a transplantes de órgãos (TAGLIALATELA; RASTELLINI; CICALESE, 2015). Desta forma, não se sabe se a administração deste ICN poderia reverter ou interromper a progressão da doença em pacientes já diagnosticados. Este trabalho também utilizou pacientes submetidos a transplantes, sendo que isto poderia interferir nos resultados, uma vez que este é um fator que não é comum a todos os pacientes que apresentam DA.

Portanto, são necessários estudos que investiguem tanto o efeito da inibição prolongada de CN sobre as alterações patológicas observadas na DA, tais como perda de memória, morte neuronal, redução da integridade sináptica e inflamação, assim como os mecanismos básicos pelos quais a CN atua na fisiopatologia dessa doença que atinge tantas pessoas ao redor do mundo.

Nesse sentido, a hipótese do presente trabalho é que o inibidor da calcineurina FK506 tem efeito protetor contra os danos cognitivos e histológicos causados pelos

eventos neurotóxicos que ocorrem durante o desenvolvimento e progressão de DA em modelos experimentais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos de um inibidor da calcineurina em modelos experimentais da doença de Alzheimer.

### **2.2. Objetivos específicos**

- a. Avaliar os efeitos de um inibidor da calcineurina sobre o comprometimento cognitivo, a perda neuronal, a ativação microglial e as alterações de vias de sobrevivências celular induzidos por injeção intrahipocampal de NMDA ou de  $A\beta_{1-42}$ ;
- b. Avaliar os efeitos de um inibidor da calcineurina e da depleção da micróglia em cultura organotípica de fatias de hipocampo submetidas ao estímulo por NMDA;
- c. Avaliar os efeitos do tratamento crônico com um inibidor da calcineurina sobre o comprometimento cognitivo, a perda neuronal, a ativação microglial e sobre o perfil de produção de fatores neurotróficos e mediadores inflamatórias em animais transgênicos para doença de Alzheimer.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Modelos *in vivo*

##### 3.1.1 Animais

No presente trabalho, foram utilizados três protocolos de experimentação *in vivo*. Para os experimentos descritos nos itens 3.1.3 e 3.1.4, utilizamos animais C57Bl/6, machos, de 8-12 semanas de idade, obtidos a partir do Biotério Central da UFMG. Para a realização de experimentos envolvendo animais transgênicos para doença de Alzheimer, descritos no item 3.1.5, utilizamos animais duplo-transgênicos APP/PS1 (B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>dE9</sup>)85Dbo/Mmjax) que expressa a PPA quimérica de camundongo/humano e a PS1 humana mutante. Os animais foram obtidos a partir do *The Jackson Laboratory* e reproduzidos e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da UFMG. Os indivíduos transgênicos (TG) ou *littermates wild-type* (WT) de *background* C57BL/6 foram obtidos a partir do acasalamento entre machos TG heterozigotos e fêmeas WT obtidas do biotério central da UFMG, de modo que a proporção de indivíduos TG esperada na cria a cada cruzamento era de 50 %. Todos os animais tinham água e ração *ad libitum* e foram submetidos ao ciclo claro-escuro de 12h. Os procedimentos experimentais aqui realizados estão de acordo com as orientações para o uso de animais de experimentação e foram aprovadas pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais sob os protocolos 200/2017 e 248/2019 (Anexos A e B).

##### 3.1.2 Reagentes

Neste trabalho, utilizou-se o ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (Sigma, EUA) e o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Human, Invitrogen, EUA). Para ativação desse peptídeo, utilizou-se o protocolo sugerido pelo fabricante, no qual são gerados oligômeros, fibrilas e placas de A $\beta$ <sub>1-42</sub> na solução final. O inibidor da calcineurina utilizado foi o FK506 (Tacrolimus; LC *laboratory*, EUA), que foi diluído em solução de DMSO 1 %, *tween* 80 5 %, em solução salina estéril. O veículo também foi utilizado como controle nos protocolos que serão descritos nos próximos itens.

As doses de FK506 escolhidas para os protocolos experimentais apresentados aqui são baseadas em outros trabalhos relacionados tanto a modelos de DA (DINELEY *et al.*, 2007, 2010; HONG *et al.*, 2010; TAGLIALATELA *et al.*, 2010), quanto



a outros modelos de neurodegeneração (BUTCHER *et al.*, 1997; DITZLER *et al.*, 2003; FIELDS *et al.*, 2016). Também é importante mencionar que FK506 é sabidamente capaz de atravessar a BHE e o tempo de pré-tratamento para o modelo agudo foi escolhido com base no tempo em que a droga atinge sua concentração máxima no cérebro de camundongos (CHRISTIANS *et al.*, 2002; IWASAKI *et al.*, 1998; MURAKAMI *et al.*, 2004; YOKOGAWA *et al.*, 1999).

### **3.1.3 Cirurgia estereotáxica**

Para viabilizar a microinjeção intrahipocampal de NMDA ou A $\beta$ <sub>1-42</sub>, animais C57Bl/6, machos, de 8-12 semanas de idade, foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de cânula. Para isso, os indivíduos foram anestesiados com solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.), submetidos a tricotomia e, em seguida, tiveram seus crânios fixados ao aparelho estereotáxico (Insight®). Uma cânula de 7 mm de comprimento foi inserida na camada molecular giro denteado do hipocampo utilizando-se as seguintes coordenadas: AP: - 1,9 mm; LL: -1.5 mm; DV: +1,8 mm. As coordenadas foram obtidas a partir do atlas do cérebro do camundongo (FRANKLIN; PAXINOS, 2008) e uma representação do local de injeção pode ser encontrada na figura 6A. Após a cirurgia, os animais foram mantidos no laboratório até a completa recuperação e, depois, levados ao biotério, onde permaneceram até a realização dos protocolos experimentais. Os experimentos foram realizados 7 dias após a cirurgia, para completa recuperação dos animais.

### **3.1.4 Modelo de neurotoxicidade induzida por microinjeção intrahipocampal de NMDA ou de A $\beta$ <sub>1-42</sub>**

No terceiro dia da tarefa de reconhecimento de objeto novo (TRO) (item 3.1.6), imediatamente após a realização da terceira etapa, os animais foram submetidos a injeção i.p. de FK506 nas doses 2,5, 5 ou 10 mg/kg ou veículo. Oitenta minutos depois da injeção, os indivíduos foram submetidos à microinjeção intrahipocampal de NMDA (40 nmol) ou solução salina estéril (salina) (Figura 6B). Para a microinjeção através da cânula, introduziu-se uma agulha de 8 mm de comprimento, acoplada a uma seringa Hamilton® de 10  $\mu$ l por meio de um fio de polietileno. O volume de 0,5  $\mu$ l de composto foi injetado com auxílio de uma bomba de infusão (Insight®), a uma

velocidade de infusão de 0,5 µl por minuto. Ao fim da infusão, esperou-se por 1 minuto adicional antes da retirada da agulha, com objetivo de evitar refluxo do composto através da cânula.

Para a microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (400 pmol) ou salina, após o pré-tratamento com FK506, utilizamos o mesmo protocolo descrito no parágrafo anterior (Figura 6C).

No modelo de microinjeção de NMDA, após a infusão, os indivíduos foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico para avaliação das crises tônico-clônicas. A avaliação foi feita por 60 minutos e filmada com auxílio de uma câmera de vídeo. Contabilizou-se o número de indivíduos que apresentaram crise, o número de crises por indivíduo e frequência de mortes após injeção de NMDA. Após 60 minutos, os animais foram devolvidos à sua caixa de origem. Uma vez que a microinjeção de A $\beta$ <sub>1-42</sub> não induz crises tônico-clônicas, os indivíduos foram devolvidos à sua caixa imediatamente após as injeções.

Finalmente, 24 h após a injeção intrahipocampal do composto, os indivíduos foram submetidos à última etapa da TRO para avaliação cognitiva. Imediatamente após a última etapa de TRO, os indivíduos foram anestesiados com solução de xilazina (8 m/kg) e cetamina (80 mg/kg) e perfundidos por via transcardíaca com tampão fosfato salina 10 mM (PBS). Após craniotomia, parte dos encéfalos foi fixada em paraformaldeído 4 % (PFA 4 %) para posterior realização de imuno-histoquímica para IBA-1 e NeuN, além da coloração por Fluoro-Jade C. Outra parte dos animais tiveram o hipocampo dissecado a frescos e armazenado em freezer -70 °C para posterior análise bioquímica.

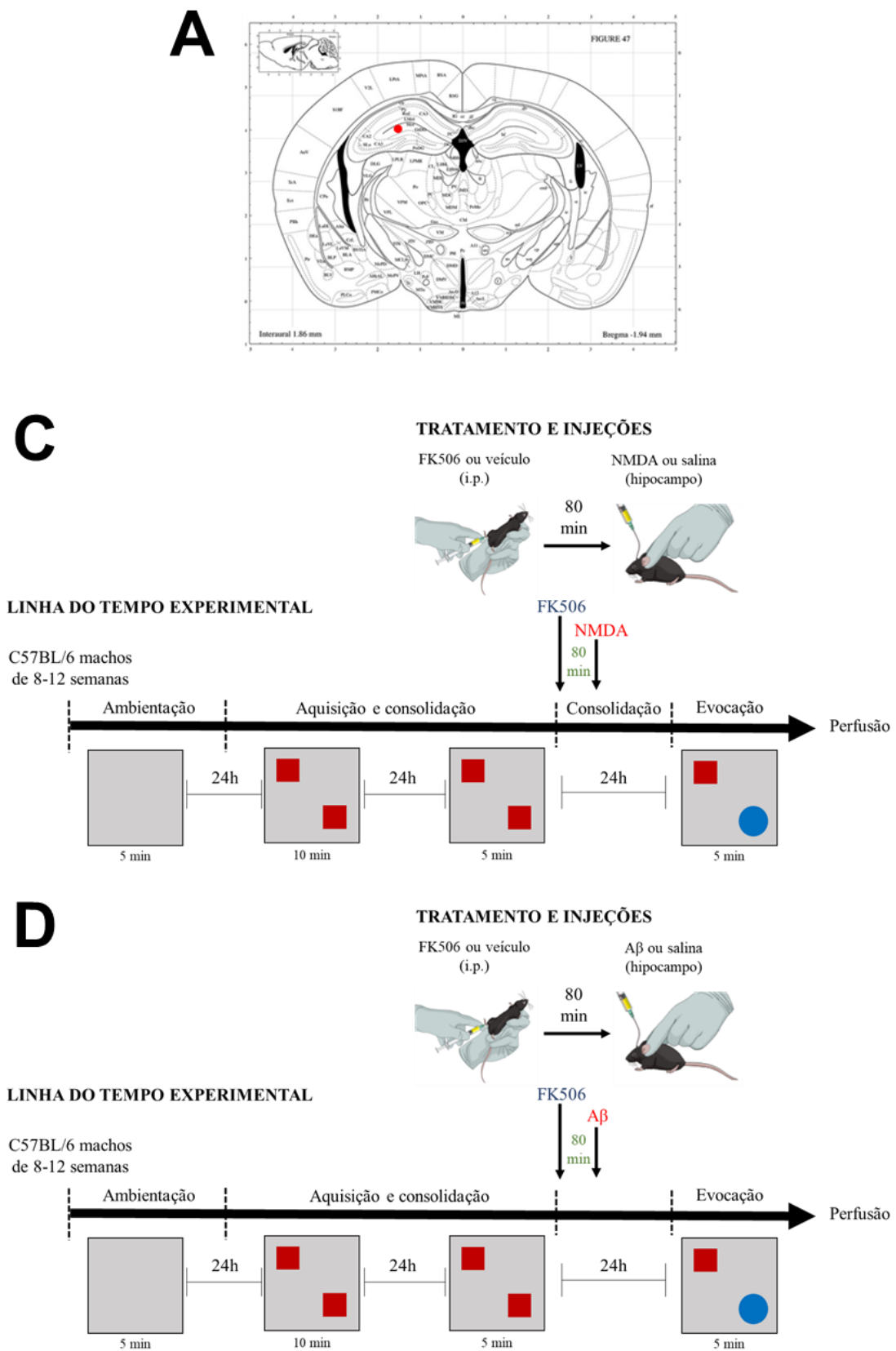


Figura 6: Modelos de microinjeção intrahipocampal de NMDA ou A $\beta$ <sub>1-42</sub>. A – NMDA, A $\beta$ <sub>1-42</sub> ou salina foram injetados na camada molecular do giro dentado, local está indicado pelo círculo vermelho; B – linha do tempo do modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA; C - linha do tempo do modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

### 3.1.5 Modelo transgênico APP/PS1: tratamento crônico com FK506

Animais duplo-transgênicos APP/PS1 [B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>dE9</sup>)85Dbo/Mmjax] (TG) ou *wild-type littermates* (WT), machos, de 12 meses de idade, foram submetidos ao tratamento com FK506 (5 mg/kg) ou veículo, por via subcutânea, uma vez ao dia, por 30 dias, de modo que, ao final do experimento, os animais possuíam 13 meses de idade. Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação comportamental por meio do labirinto em cruz elevado (LCE), da tarefa exploratória de campo aberto (CA), TRO e o teste de interação e memória social (IMS). Os protocolos utilizados podem ser encontrados no item 3.1.6. Ao 24º dia de injeção, os indivíduos foram submetidos ao LCE, seguido do CA ao 25º dia, ao TRO entre os dias 26 e 29 e, finalmente, ao teste IMS ao 30º dia de injeção (Figura 7). Todos os indivíduos foram eutanasiados imediatamente após o último dia de avaliação comportamental.

A eutanásia foi feita por meio de perfusão transcardíaca com solução PBS de indivíduos submetidos a anestesia por solução de xilazina (8 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg). Após a craniotomia e dissecação, o hemisfério esquerdo foi armazenado em solução de PFA 4 % para fixação do tecido e hipocampo e córtex pré-frontal do hemisfério direito foram coletado a fresco e armazenados em freezer -70 °C para posterior análise bioquímica.

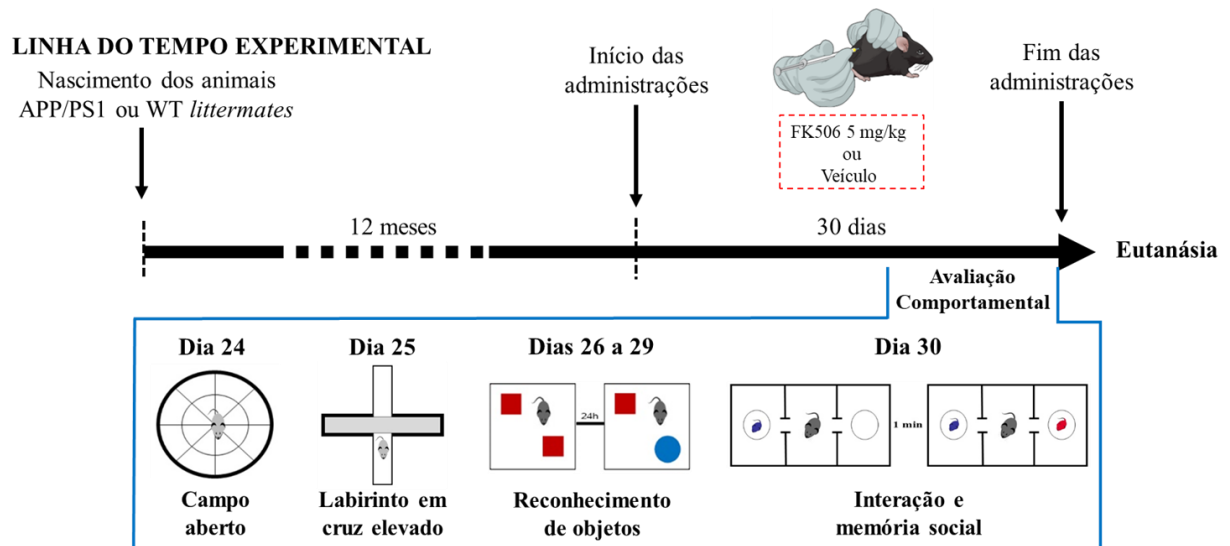


Figura 7: Linha do tempo experimental do tratamento crônico com FK506 em animais transgênicos APP/PS1. O tratamento foi iniciado quando os indivíduos possuíam 12 meses de idade. Indivíduos TG ou WT receberam FK506 5 mg/kg por 30 dias e as avaliações comportamentais foram feitas entre os dias 24 e 30 de injeção.

### 3.1.6 Tarefa de reconhecimento de objeto novo

A TRO foi realizada em um aparato de fundo branco quadrado (30 x 30 x 20 cm) e é constituída por quatro etapas, separadas entre si por um tempo de 24 h. Na primeira etapa, os animais são expostos ao aparato vazio e podem explorar livremente o mesmo por 5 minutos. Na segunda etapa, os animais são expostos ao aparato contendo dois objetos idênticos por 10 min. Os objetos foram dispostos na transversal e afastados da parede em 5 cm e os indivíduos puderam explorar livremente. Na terceira etapa, repetiu-se a exposição aos objetos idênticos, mas por um período de 5 minutos. Por fim, na quarta etapa um dos objetos é substituído por um objeto novo e os indivíduos puderam explorar livremente os objetos e o aparato por 5 minutos. Em todos os dias de experimento, os animais foram submetidos ao teste comportamental 30 min após a injeção de FK506 ou veículo. O teste foi filmado por uma câmera de vídeo acoplada a um computador e os vídeos foram analisados posteriormente. Para avaliação, utilizou-se o tempo de exploração do objeto antigo e o tempo de exploração do objeto novo obtidos na quarta etapa. Os resultados foram mostrados na forma de índice de reconhecimento de objeto novo (IRO), obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{IRO} = \text{Tempo objeto novo} / (\text{tempo objeto novo} + \text{tempo objeto antigo})$$

A TRO é mais amplamente utilizada para avaliação da memória declarativa episódica (ANTUNES; BIALA, 2012; LUEPTOW, 2017) e a protocolo de avaliação 24 h após a fase de aquisição foi feita para avaliar a memória de longa duração.

### 3.1.7 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é constituído por dois braços abertos e dois fechados (30 x 5 cm) colocados em posições opostas, e uma plataforma central (5 x 5 cm) (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008). Os braços fechados possuem paredes de 15 cm de altura, enquanto nos braços abertos não há paredes. Os braços e a plataforma central são feitos de acrílico de cor branca e elevados a 30 cm do chão. Trinta minutos após a injeção de FK506 ou veículo, os animais foram colocados na plataforma central do LCE, soltos com a face virada para um dos braços abertos, permitindo-se a exploração do ambiente por um período de 5 min. Após cada animal o LCE foi limpo com uma solução de etanol a 70 %. Os testes foram gravados por meio de uma câmera acoplada a um computador e os vídeos foram analisados com auxílio do programa Any-Maze (Stöelting©). Os seguintes parâmetros analisados

foram: tempo de permanência total nos braços abertos e tempo de permanência total nos braços fechados.

O LCE foi inicialmente desenhado e é amplamente usado para avaliação do comportamento do tipo ansioso em roedores (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008; LISTER, 1987; WALF, ALICIA A.; FRYE, 2007). O paradigma está baseado no comportamento do tipo aproximação-esquiva observado nessas espécies animais. Nesse sentido, o maior tempo de permanência dos animais nos braços fechados do LCE indicam um efeito do tipo ansiogênico, enquanto maior tempo de exploração dos braços abertos e redução de permanência nos braços fechados indicam efeito do tipo ansiolítico.

### **3.1.8 Campo aberto**

O aparato do campo aberto (CA) é composto por uma caixa de acrílico cilíndrica transparente (30 cm de diâmetro) de fundo branco. Esse paradigma é utilizado na literatura como uma forma de avaliar a atividade locomotora ou a tarefa exploratória em roedores (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015; STANFORD, 2007). Trinta minutos após a injeção de FK506 ou veículo, os animais foram colocados no centro do aparato e deixados no campo aberto por 10 min. Acima do aparato, foi colocada uma câmera de vídeo conectada a um computador e todos os testes foram gravados em vídeo e posteriormente analisados com auxílio do programa Any-Maze (Stöelting©). O parâmetro analisado foi a distância percorrida. Após cada teste, o aparato foi limpo com álcool 70 % para remover pistas olfatórias.

### **3.1.9 Interação e memória social**

O teste de interação e memória social (IMS) é constituído de 3 etapas realizadas em sequência. Trinta minutos após a injeção de FK506 ou veículo, os animais foram colocados na câmara central de um aparato que contém 3 câmaras (dimensão total de 60 x 40 x 23 cm), separadas entre si por uma parede e que poderiam ser interligadas por meio de uma porta com controle de passagem. Inicialmente, os animais permaneceram por 5 min na câmara central para ambientação. Em seguida, um indivíduo juvenil (~30 dias de idade) foi colocado em um cilindro dentro de um dos compartimentos da extremidade do aparato. De forma complementar, um cilindro vazio foi colocado na câmara da outra extremidade. As

passagens que ligam as câmaras foram abertas e os animais puderam explorar livremente os 3 compartimentos por 10 min. Essa é a etapa de avaliação da interação social (IS), na qual é avaliada o percentual de tempo que o animal permanece explorando o comportamento no qual se encontra o juvenil.

Ao final dessa etapa, os indivíduos foram reinseridos na câmara central e as passagens foram fechadas. Então, ao cilindro vazio adicionou-se um segundo juvenil, de ninhada diferente do primeiro. As passagens foram novamente abertas e o animal experimental pode explorar livremente as 3 câmaras do aparato por 10 min. Essa é a etapa de avaliação da memória social (MS), na qual os na qual é avaliada o percentual de tempo que o animal permanece explorando o comportamento no qual se encontra o juvenil recém colocado.

Todo o teste foi filmado com auxílio de uma câmera de vídeo acoplada a um computador e os vídeos foram avaliados com auxílio do programa Any-Maze (Stöelting©). Para avaliação do percentual de interação social, utilizou-se a seguinte fórmula:  $IS = [\text{tempo exploração juvenil} / (\text{tempo de exploração juvenil} + \text{tempo de exploração vazio}) \times 100]$ . Para avaliação do percentual de memória social, utilizou-se a seguinte fórmula:  $MS = [\text{tempo exploração juvenil novo} / (\text{tempo de exploração juvenil novo} + \text{tempo de exploração juvenil antigo}) \times 100]$ .

### **3.1.10 Perfusão e microtomia**

Após a realização dos protocolos experimentais descritos nos itens 3.1.4 e 3.1.5, parte dos animais foi anestesiada com solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) por via i.p. e perfundidos por via transcardíaca com PBS e PFA 4% e os encéfalos foram armazenados PFA 2 % até a realização da microtomia. Posteriormente, os cérebros foram seccionados em vibrátomo (Leica, USA) em plano coronal na espessura de 50  $\mu\text{m}$ . As secções do cérebro de cada animal foram divididas em cinco amostras igualmente representativas de todo o eixo anteroposterior do cérebro para posterior processamento histológico.

Cada umas das amostras igualmente coletadas foram submetidas a uma das técnicas histológicas utilizadas no presente estudo, de modo que para cada técnica, regiões semelhantes foram avaliadas.

### 3.1.11 Coloração por *Fluoro-Jade C*

Com objetivo de avaliar os efeitos do FK506 sobre o processo neurodegenerativo induzido pela microinjeção de NMDA ou de  $A\beta_{1-42}$ , fatias de 50  $\mu\text{M}$  obtidas a partir de animais submetidos à microinjeção de NMDA ou de  $A\beta_{1-42}$  foram submetidas à técnica de coloração por Fluoro-Jade C (FJC) (SCHMUED *et al.*, 2005). Para isso, foram utilizadas 3 fatias de cada animal, variando entre o bregma – 1,82 e 2,30 mm. Inicialmente cortes foram submetidos a uma bateria de hidratação em álcool 80 % em solução básica, seguido de álcool 70 %. Em seguida os cortes foram submersos em solução de permanganato de potássio, seguido de solução de FJC (0,0001 %) (Merk Millipore, EUA). Para avaliação da marcação, foram feitas fotomicrografias das regiões CA1 e giro denteado (GD) do hipocampo na objetiva de 20x, as imagens foram avaliadas com auxílio do programa ImageJ (NIH) e os dados foram expressos na forma de área marcada.

### 3.1.12 Imuno-histoquímica

Com objetivo de avaliar os efeitos do FK506 sobre o perfil microglial e a integridade neuronal no hipocampo de animais submetidos à microinjeção de NMDA ou de  $A\beta_{1-42}$ , ou ainda o conteúdo de  $A\beta_{1-42}$  no hipocampo de animais APP/PS1, fatias de 50  $\mu\text{M}$  foram submetidas à imuno-histoquímica para Iba-1 (microglia), NeuN (corpos de neurônios) e  $A\beta_{1-42}$ . Para isso, foram utilizadas amostras inteiras, contendo fatias de todo o eixo anteroposterior do cérebro. Inicialmente, os cortes foram incubados em tampão citrato por 1h (pH 6.0, 70° C) para recuperação antigênica, seguido de incubação em solução de H2O2 1 % por 15 min, para inativação da peroxidase endógena, soro de bloqueio (BSA 4 %, Triton 0,5 %, em TBS) por 1 h e em anticorpo anti-Iba-1 (Wako, 1:500), anti-NeuN (1:800) ou anti- $A\beta_{1-42}$  (Cell Signaling, 1:1600) por 48 h. Em seguida, as fatias foram incubadas em anticorpo secundário anti-rabbit (1:500) *overnight*, seguido de solução avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Vector) e, por fim, a imunohistoquímica foi revelada utilizando solução de diaminobenzidino (DAB).

### 3.1.13 Aquisição, análise e processamento das imagens

Para obtenção de fotomicrografias de fatias imunomarcadas por NeuN, Iba-1 ou  $A\beta_{1-42}$  ou coradas por FJC, utilizamos câmera digital (Microfire, Optronics, CA,



USA) acoplada a microscópio Zeiss Imager A.2. As fotomicrografias foram feitas utilizando-se a objetiva de 20x para imagens de FJC, de 10x para imagens de imunomarcação de NeuN e Iba-1 e de 5x para imagens de imunomarcação de A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Todas as imagens foram analisadas com auxílio do programa ImageJ (NIH) por meio do método de análise de partículas.

Para quantificação da coloração por FJC, utilizamos os dados de área ocupada por FJC em pixels obtidos a partir de fotomicrografias do GD e de CA1 de 3 fatias consecutivas do hipocampo, localizadas entre o bregma – 1,82 e 2,30 mm. Para realização das análises, as imagens foram convertidas para o formato de 8 *bits* e em seguida aplicou o método de *threshold*, utilizando-se o algoritmo *default*, para obtenção da área marcada. Com objetivo de avaliar o impacto do pré-tratamento com 5 ou 10 mg/kg de FK506 sobre a amplitude do efeito da microinjeção de NMDA ou A $\beta$ , os valores de área marcada foram transformados em delta ( $\Delta$ ) entre os indivíduos que receberam microinjeção de estímulo neurotóxico (NMDA ou A $\beta$ ) e aqueles que receberam microinjeção de salina, para cada uma das doses de FK506 utilizadas ou veículo. Os dados foram expressos na forma de  $\Delta$  da área ocupada.

Para a avaliação da imunomarcação por NeuN, obtivemos fotomicrografias de 3 fatias consecutivas do hipocampo, localizadas entre o bregma – 1,82 e 2,30 mm. Para realização das análises, as imagens foram convertidas para o formato de 8 *bits* e em seguida aplicou o método de *threshold*, utilizando-se o algoritmo *moments*, para obtenção da intensidade média. A densidade óptica (DO) foi gerada por meio do logaritmo da razão entre a intensidade máxima em pixels (255) e a intensidade média em pixels obtida a partir de cada fatia imunomarcada [ $\log(255/\text{intensidade})$ ]. As avaliações foram feitas utilizando-se fotomicrografias da camada granular do GD e da camada piramidal de CA1.

Para estimativa do número de células Iba-1-positivas no GD do hipocampo de animais submetidos aos modelos de microinjeção de NMDA ou de A $\beta$ , utilizamos o método de quantificação por estereologia, que será detalhado no próximo item. Na impossibilidade de individualizar as células Iba-1-positivas presentes em aglomerados de células encontrados em fatias cérebro de animais transgênicos, optamos pela avaliação da densidade integrada, que representa o produto entre a área e a intensidade média. Para tal avaliação, utilizamos fotomicrografias do GD e de CA1 de 3 fatias consecutivas do hipocampo, localizadas entre o bregma – 1,82 e 2,30 mm.

Para realização das análises, as imagens foram convertidas para o formato de 8 *bits* e em seguida aplicou o método de *threshold*, utilizando-se o algoritmo *moments*, para obtenção da densidade integrada. Essa variável foi usada com objetivo refletir na análise as regiões de maior intensidade encontradas em aglomerados de células.

Para a análise do conteúdo de placas de A $\beta_{1-42}$ , obtivemos fotomicrografias de 3 fatias consecutivas do hipocampo, localizadas entre o bregma – 1,82 e 2,30 mm. Para realização das análises, todo o giro denteado foi delimitado, as imagens foram convertidas para o formato de 8 *bits* e em seguida aplicou o método de *threshold*, utilizando-se o algoritmo *moments*, para obtenção do percentual da área ocupada.

### 3.1.14 Estereologia

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

Como já mencionado no item 3.1.10, fatias de 50  $\mu\text{m}$  foram obtidas de maneira alternada e em sequência de 5 amostras por animal, sendo que cada amostra continha todo o eixo anteroposterior do cérebro por animal. Distância fixa e conhecida entre as fatias é pré-requisito para a realização do método estereológico aqui proposto. Apesar de fatias de todo o eixo anteroposterior terem sido submetidas à imuno-histoquímica, apenas o hipocampo foi avaliado, sendo que foram utilizadas 4 ou 5 fatias que continham hipocampo por animal.

A determinação do número de micróglia da camada polimórfica do GD do hipocampo foi feita por meio do método do fracionador óptico, através da distribuição sistemática e aleatória de blocos de contagem, dentro de uma série de secções que continham a região de interesse e foram estimados multiplicando-se o número de células contadas dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra. Esses valores dependem: 1) do número de secções investigadas comparadas com o

número total de secções que contém a região de interesse; 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem; e 3) da altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos. As caixas de contagem possuíam dimensões de 30 x 30 x 10  $\mu\text{m}$ , distantes entre si em 50  $\mu\text{m}$  e com zona de guarda de 2  $\mu\text{m}$ .

As células Iba-1-positivas foram classificadas em não-ameboides e ameboides, como pode ser visto na figura 8. Ao final, foram geradas análises do número total de células Iba-1-positivas, número de células Iba-1-positivas não-ameboides e células Iba-1-positivas ameboides.

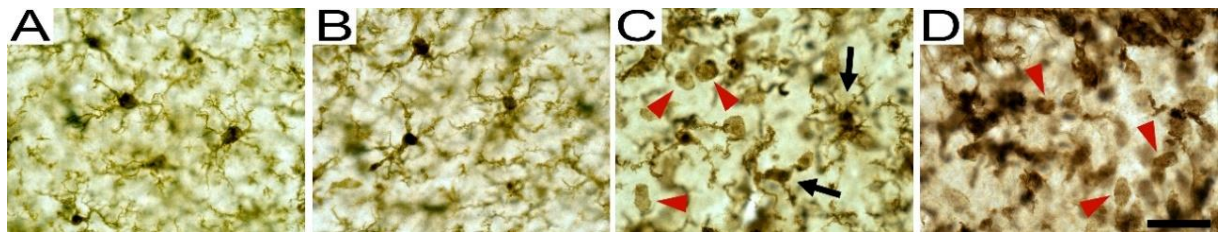


Figura 8: Caracterização das células Iba-1-positivas não ameboides e células Iba-1-positivas ameboides na camada polimórfica do DG do hipocampo. A e B – células Iba-1-positivas não-ameboides; C – presença de células não-ameboides (setas pretas) e de células ameboides (cabeça de seta vermelha). D – Presença de células ameboides (cabeça de seta vermelha). Objetiva de 100X. Escala = 25  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.15 Western blot

Com objetivo de avaliar os efeitos do FK506 sobre a ativação de Akt e Erk no hipocampo de animais submetidos à microinjeção de NMDA ou de  $\text{A}\beta_{1-42}$ , amostras de hipocampo de indivíduos submetidos à microinjeção de NMDA ou  $\text{A}\beta$  foram lisadas em tampão Rippa (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 140 mM; P-40 1 %; deoxicolato de sódio 1% e SDS 0,1 %) contendo inibidor de protease (Sigma) e inibidor de fosfatase (Cell Signaling). A quantificação proteica foi feita por meio da técnica de Bradford e aplicou-se 30  $\mu\text{g}$  do lisado total em eletroforese em gel de poliacrilamida 10 %, e em seguida foi realizada a eletrotransferência para membranas de nitrocelulose.

As membranas foram incubadas em solução de bloqueio [BSA 5 % ou leite 8 %, diluídos em tampão tris salina 10 mM contendo 0,1 % de Tween-20 (TBST)] por 2 h. Em seguida, as membranas foram incubadas em anticorpo primário anti-fosfo-AKT (1:1000; DB Biotech), anti-AKT (1:1000; DB Biotech), anti-fosfo-ERK 1,2 (1:1000; DB Biotech), anti-ERK 1,2 total (1:1000; DB Biotech) e anti-actina (anti-coelho, 1:2500;

Sigma-Aldrich). Em seguida, as membranas foram lavadas por 3 vezes em TBST e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com peroxidase (anticoelho, 1:2500, Life Technologies). Por fim, as membranas foram incubadas com agente quimioluminescente ECL (GE Healthcare), a densidade óptica das bandas foi detectada por meio do equipamento de leitura de quimioluminescência e as imagens foram quantificadas com auxílio do programa ImageJ (NIH).

Todos os resultados foram normalizados pelos níveis de actina ou da respectiva proteína total de cada proteína fosforilada. Para a avaliação estatística, considerou-se sempre o grupo que recebeu injeção i.p. de veículo e microinjeção intrahipocampal de salina (Veículo + Salina) como grupo controle, transformando a leitura de densidade da banda desse grupo em 100 % para cada membrana analisada e calculando o percentual de aumento ou redução dos demais grupos em relação ao controle.

### **3.1.16 Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Amostras de HIP ou CPF obtidas a partir de animais TG ou WT, tratados com FK506 ou veículo, foram homogeneizadas em tampão de extração de citocinas [Tris-HCl 2 mM pH 8.0; 1337 mM NaCl; 1 % NP40; glicerol 10 %; flúorido fenilmetilsulfonil (PMSF) 0.1 mM; pepstatina A 1 µM; EDTA 10 mM; E-64 10 µM e vanadato de sódio 0.5 mM diluídos em água destilada] e centrifugadas a 14.000 rpm a 4 °C por 20 min. Em seguida, realizou-se o ensaio imunoenzimático utilizando-se *kit* específico da R&D Systems (DuoSet) para detecção das concentrações das proteínas BDNF, GNF, GDNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e CX3CL1, de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda 490 nm. As concentrações foram apresentadas na forma de ng/mL.

O número de indivíduos utilizado por técnica e em cada modelo experimental *in vivo* pode ser encontrado nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1: Número de indivíduos utilizados por grupo e por técnica experimental no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA.

	Vei	Vei	FK 2,5	FK 2,5	FK 5	FK 5	FK 10	FK 10
	+	+	+	+	+	+	+	+
Técnica	Sal	NMDA	Sal	NMDA	Sal	NMDA	Sal	NMDA
TRO	7	7	6	6	6	7	6	8
FJC	6	5	-----	-----	4	6	4	6
IHQ NeuN	6	5	-----	-----	4	6	4	5
IHQ Iba-1	4	4	-----	-----	4	4	4	4
WB Akt	5	5	-----	-----	5	5	-----	-----
WB Erk	5	5	-----	-----	5	5	-----	-----

TRO – tarefa de reconhecimento de objeto novo; FJC – Coloração por Fluoro Jade C; IHQ NeuN – imuno-histoquímica para NeuN; IHQ Iba-1 – imuno-histoquímica para Iba-1; WB Akt – *western blot* para Akt; WB Erk – *western blot* para Erk.

Tabela 2: Número de indivíduos utilizados por grupo e por técnica experimental no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

	Vei	Vei	FK 2,5	FK 2,5	FK 5	FK 5	FK 10	FK 10
	+	+	+	+	+	+	+	+
Técnica	Sal	A $\beta$	Sal	A $\beta$	Sal	A $\beta$	Sal	A $\beta$
TRO	7	7	6	7	6	8	6	8
FJC	6	7	-----	-----	4	7	4	7
IHQ NeuN	6	5	-----	-----	4	5	4	5
IHQ Iba-1	4	4	-----	-----	4	4	4	4
WB Akt	4	4	-----	-----	4	4	-----	-----
WB Erk	4	4	-----	-----	4	4	-----	-----

TRO – tarefa de reconhecimento de objeto novo; FJC – Coloração por Fluoro Jade C; IHQ NeuN – imuno-histoquímica para NeuN; IHQ Iba-1 – imuno-histoquímica para Iba-1; WB Akt – *western blot* para Akt; WB Erk – *western blot* para Erk.

Tabela 3: Número de indivíduos utilizados por grupo e por técnica experimental no modelo transgênico APP/PS1.

Técnica	WT + Vei	WT + FK506	TG + Vei	TG + FK506
Comportamento	8	8	9	9
IHQ NeuN	5	5	5	4
IHQ Iba-1	5	5	5	4
IHQ A $\beta$ <sub>1-42</sub>	-----	-----	3	3
ELISA	6	8	7	8

IHQ NeuN – imuno-histoquímica para NeuN; IHQ Iba-1 – imuno-histoquímica para Iba-1; IHQ A $\beta$ <sub>1-42</sub> – A $\beta$ <sub>1-42</sub>; Ensaio imunoenzimático para detecção dos níveis de fatores neurotróficos e citocinas.

### 3.2. Modelo *ex vivo*

#### 3.2.1. Animais

Para obtenção das culturas organotípicas, foram utilizados animais neonatos com idade entre 1 e 3 dias, machos ou fêmeas, obtidos a partir do Centro para Modelos Experimentais e Animais Transgênicos da Universidade de Freiburg (Freiburg, Alemanha). Os experimentos estão de acordo com as leis alemãs para o uso de animais de experimentação e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade de Freiburg sob protocolo X-19/06R (Anexo C).

#### 3.2.2. Reagentes e drogas

Para os experimentos *in vitro*, utilizamos como estímulo neurotóxico o ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (Sigma, EUA) diluído em DPBS (DPBS; Gibcorby Life Technologies, Germany) para solução estoque de concentração 100 mM e foi utilizado em concentração final de 15  $\mu$ M. Para o tratamento com inibidor de calcineurina, utilizamos FK506 (Tacrolimus; LC *laboratory*, EUA), que foi diluído em solução de DMSO para concentração estoque de 50 mM e foi utilizado nas concentrações finais de 1 e 10  $\mu$ M. Para realização dos experimentos, utilizou-se 1  $\mu$ L de solução contendo FK506 em 1 mL de meio de cultivo, sendo que a concentração final de DMSO na solução foi de 0,1 %.

### 3.2.3. Toxicidade induzida por NMDA em cultura organotípica de fatias de hipocampo

Para obtenção das culturas organotípicas, animais neonatos foram decapitados dentro do ambiente estéril de uma capela de fluxo laminar. Os hipocampos foram dissecados em meio de cultura gelado (glicerol 4 %, tampão HEPES 1 M, HBSS 1X), fatiados em espessura de 350  $\mu$ M com o auxílio de um fatiador de tecidos (McIlwain™) e transferidos para uma placa de cultura contendo um *insert* com membrana de poro 0,4  $\mu$ M. Cada poço continha 6 fatias de hipocampo, que foram mantidos em meio de cultivo [meio essencial (MEM) 0,5X, soro de cavalo 25 %, meio basal livre de glutamato (BME) 25 %, glutamax 2 mM e glicose 0.35 %] em estufa úmida a 35 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. As culturas foram mantidas por pelo menos 7 dias previamente ao experimento e o meio foi trocado a cada 2 dias.

No dia da estimulação, FK506 foi diluído em 1 mL de meio de cultivo em concentrações finais de 1 ou 10  $\mu$ M. Como controle negativo, utilizou-se meio de cultivo contendo 0,1 % de DMSO. Trinta minutos antes do estímulo com NMDA ou PBS, o meio contido nos poços foi retirado e substituído pelos meios contendo FK506 (ou controle negativo). Após 30 min de incubação, adicionou-se 10  $\mu$ L de solução NMDA 1,5 mM (concentração final de 15  $\mu$ M na cultura) ou PBS por 4 h. Ao final, as culturas foram lavadas em DPBS gelado e as placas foram armazenadas em freezer -80 °C até sua utilização. Um esquema da distribuição dos grupos nas placas pode ser encontrado na figura 9A. Utilizamos 3 placas de cultura obtidas e estimuladas em dias diferentes.

### 3.2.4. Depleção da micróglia em cultura organotípica de fatias de hipocampo

As fatias de hipocampo para cultura organotípica foram obtidas como já descrito no item 3.2.4. Após a obtenção das fatias, as mesmas foram transferidas para *insert* com membrana de poro 0,4  $\mu$ M em poços de placas de cultura contendo meio de cultivo com adição do depletor de micróglia clodronato dissódico (1 mg/mL). As fatias foram incubadas em meio contendo clodronato por 24 h em estufa úmida a 35 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, as fatias foram lavadas com DPBS aquecido a 37 °C e um novo meio de cultivo padrão sem clodronato foi adicionado. As culturas foram mantidas em estufa úmida a 35 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> por pelo menos 7 dias previamente ao experimento e o meio era trocado a cada 2 dias. O tratamento com clodronato por

24 h é capaz de depletar mais de 95 % das micróglia do tecido (MARKOVIC *et al.*, 2005; VINET *et al.*, 2012).

A estimulação com FK506 e NMDA foi feita da mesma forma como já descrito no item 3.2.3 e um esquema com a distribuição dos grupos nas placas pode ser encontrado na figura 9B. Utilizamos 3 placas de cultura obtidas e estimuladas em dias diferentes.

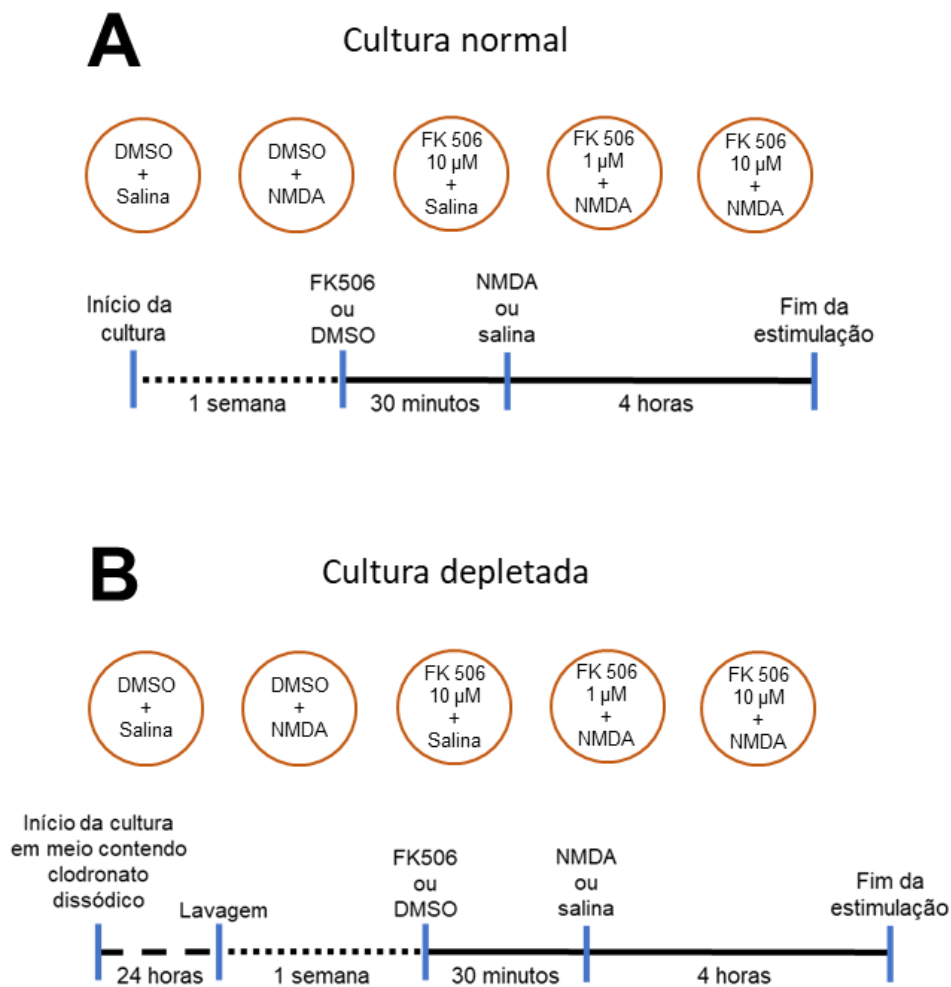


Figura 9: Protocolo de estimulação das culturas organotípicas de fatias de hipocampo. A – Culturas normais foram tratadas com FK506 ou DMSO e depois estimuladas com NMDA ou salina. B – Para depleção da micróglia, as culturas foram incubadas em clodronato dissódico por 24 horas. Para o protocolo experimental, foram tratadas com FK506 ou DMSO e depois estimuladas com NMDA ou salina.

### 3.2.5. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O isolamento do RNA de fatias obtidas a partir dos experimentos descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4 foi feito utilizando o *kit Gene MATRIX Universal RNA Purification*



(Roklon) e o procedimento foi feito de acordo com as orientações do fabricante. Para obtenção do cDNA, utilizou-se 500 ng de RNA na presença de 2 ng de oligonucleotídeos hexaméricos aleatórios (*random hexamer oligonucleotides*), para hibridização, em um volume total de 30  $\mu$ L e desnaturados a 70 °C por 10 min. O cDNA foi usado para realização do RT-qPCR utilizando-se o sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munique, Alemanha). Os dados foram apresentados na forma de expressão relativa à proteína constitutiva GAPDH. Os primers foram desenhados com auxílio da *Universal ProbeLibrary System Assay Design*. As sequências dos *primers* podem ser encontradas na tabela 4.

Tabela 4: Sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados para avaliação por meio RT-qPCR.

<i>Primer</i>		Sequência
NeuN	F	aag aag cct ggg aac cca ta
	R	ggc cca tag act gtt cct acc
Iba-1	F	cag gga ttt gca ggg agg aaa
	R	agt ttg gac ggc aga tcc tc
GFAP	F	tcg aga tcg cca cct aca g
	R	gtc tgt aca gga atg gtg atg c
TNF- $\alpha$	F	cct cct ggc caa cgg cat gg
	R	agc gct gag ttg gtc ccc ct
BDNF	F	gcc gca aac atg tct atg agg gtt
	R	ttg gcc ttt gga tac cgg gac tt
NGF	F	act gag cgc cag tta cgc
	R	cgf aga cct tgt gat cca tcg
TGF $\beta$	F	tgg agc aac atg tgg aac tc
	R	gtc agc agc cgg tta cca
Bcl2	F	tgaccacctagagccttgga
	R	gctgcattgtcccgtaga
BAD	F	gaggaaggcgggtggagac
	R	gctcactcggctcaaactct
SOD1	F	caggacctcattttaatcctcac
	R	tgcccagggtctccaacat
SOD2	F	tgctctaatacaggaccattg
	R	gtagtaagcgtgctcccacac

NeuN – marcador neuronal, BDNF – fator neurotróficos derivado do cérebro, TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral, TGF $\beta$  – fator de transformação do crescimento, GFAP – proteína fibrilar ácida glial, Iba-1 – molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado, Bcl2 – fator de linfoma de célula B 2, SOD1 – superóxido dismutase 1, SOD2 – superóxido dismutase 2, Bad – antagonista Bcl2 de morte celular, NGF – fator de crescimento neuronal, F – *Forward*; R – *reverse*.

### 3.3. Análise estatística

Para avaliação da frequência de indivíduos com crise ou frequência de mortes no modelo de microinjeção de NMDA, utilizamos o teste de associação do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Para análise estatística da TRO, IS e MS utilizou-se o teste t para uma amostra, considerando a média teórica de 0.5 (50 % de exploração em cada objeto). Aplicamos o teste t para avaliação da área ocupada por placas A $\beta_{1-42}$  e para avaliação do número de aglomerados de micróglias entre indivíduos transgênico APP/PS1 tratados com veículo ou com FK506. Utilizamos ANOVA um critério para a análise da quantidade de crises no modelo de microinjeção de NMDA, para a análise da coloração por FJC e para a quantificação de proteína por *western blot*, aplicando-se o pós-teste de Tukey quando adequado. Aplicamos ANOVA dois critérios para avaliação dos dados obtidos a partir da imunomarcagem por NeuN e Iba-1, para a análise de peso, de LCE, de CA e das concentrações de fatores neurotróficos e citocinas, aplicando-se o pós-teste de *Tukey* quando adequado. Considerou-se diferença estatisticamente significativa sempre que  $p < 0.05$  (nível de significância 5 % e intervalo de confiança de 95 %).

Para avaliação dos efeitos do estímulo com NMDA ou do tratamento com FK506 em culturas organotípicas, utilizamos como controle o grupo que foi tratado com DMSO e estimulado com salina. Esse grupo foi representado com valor absoluto de 1 para cada gene avaliado e para cada corrida de PCR em tempo real. Para avaliação estatística, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis. Quando adequado, aplicamos o pós-teste de Dunn, comparando os grupos experimentais ao grupo controle.

## 4. Resultados

### 4.1. O FK506 não impediu as crises tônico-clônicas ou as mortes induzidas por NMDA

Sabendo que a microinjeção por NMDA provoca crises convulsivas, que pode culminar em morte, e que isso pode estar associado a um padrão de neurotoxicidade, nós avaliamos os efeitos do FK506 sobre a frequência e número de crises e sobre a frequência de mortes em indivíduos submetidos à microinjeção de NMDA. Inicialmente, percebemos que 35 % dos animais submetidos à microinjeção de NMDA apresentam crise, com média de  $1,16 \pm 0,16$  crises por animal. O pré-tratamento com as doses de 2,5 e 10 mg/kg de FK506 elevou o percentual de presença de crises para 67 e 50 %, respectivamente. A dose de 5 mg/kg de FK506 não alterou o perfil da presença de crises ( $\chi^2$  para associação entre presença de crises e FK506 = 288,2,  $p < 0,0001$ ) (Figura 10A). O FK506 não alterou a quantidade média de crises por animal (ANOVA um-critério,  $F_{(3, 16)} = 0,81$ ,  $p = 0,506$ ) (Figura 10B).

Além disso, houve percentual de mortes de 28 % nos indivíduos tratados apenas com veículo. Já os percentuais para os animais tratados com as doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg foram de 33, 32 e 20 %, respectivamente, sem associação entre mortes e o tratamento ( $\chi^2$  para associação entre presença de mortes e FK506 = 5,168,  $p = 0,159$ ) (Figura 10C). Não houve crise ou morte em qualquer dos animais que receberam injeção intrahipocampal de solução salina estéril.

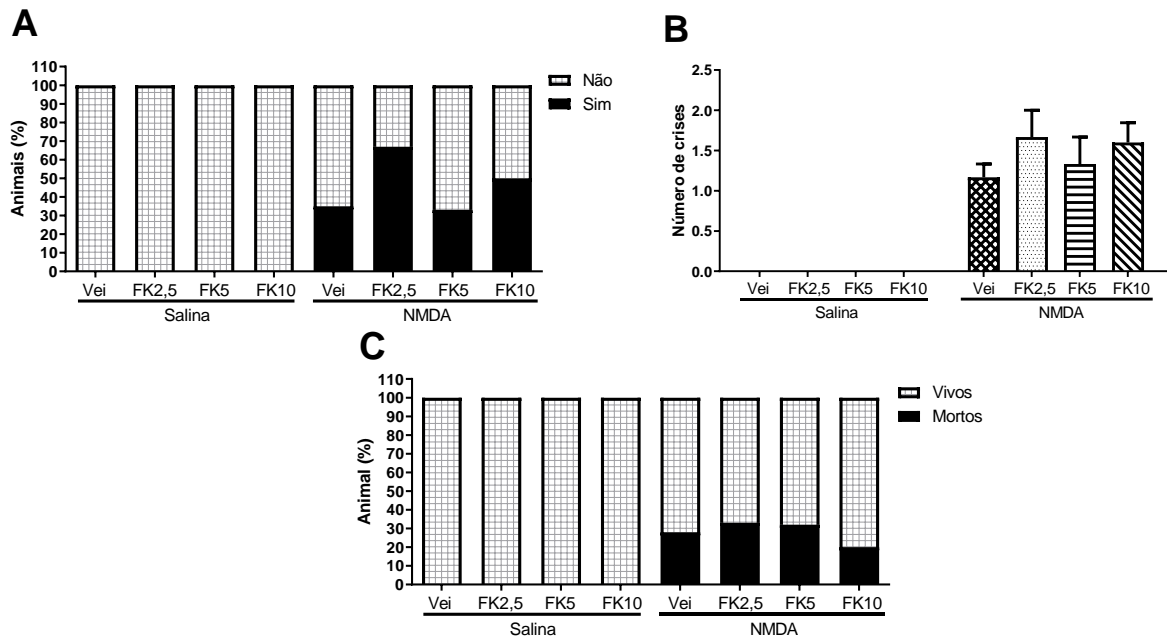


Figura 10: Perfil da presença de crises, quantidade de crises e presença de morte em animais no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA. Percentual de animais que apresentaram crise (A), quantidade de crises por animal (B) e percentual de mortes (C). N (Vei + Sal = 7, Vei + NMDA = 9, FK 2,5 + Sal = 6, FK 2,5 + NMDA = 9, FK 5 + Sal = 6; FK 5 + NMDA = 9, FK 10 + Sal = 6, FK 10 + NMDA = 10).

#### 4.2. O FK506 impediu o comprometimento cognitivo induzido por NMDA

Quanto à TRO, percebemos que indivíduos que receberam microinjeção hipocampal de salina (precedida por injeção i.p. de veículo) foram capazes de distinguir o objeto novo (Teste t para uma amostra,  $t_{(6)} = 8,214$ ,  $p = 0,0002$ ) (Figura 11A). Por outro lado, indivíduos que receberam NMDA (precedido de veículo) não reconheceram o objeto novo (Teste t para uma amostra,  $t_{(6)} = 0,45$ ,  $p = 0,668$ ). De modo interessante, a dose de 5 mg/kg de FK506 foi capaz de evitar o comprometimento cognitivo induzido por NMDA (Teste t para uma amostra,  $t_{(6)} = 3,26$ ,  $p = 0,017$ ) (Figura 11A). As doses de 2,5 ou 10 mg/kg de FK506 não foram capazes de evitar tal comprometimento (Anexo D). Também é importante mencionar que o pré-tratamento com qualquer dose de FK506, seguido de microinjeção de salina não induziu déficit no reconhecimento do objeto novo (Anexo D).

Ainda acerca do mesmo paradigma comportamental, avaliamos a distância total percorrida na caixa no qual o teste é feito e percebemos um aumento na distância percorrida por animais que receberam NMDA (precedida por injeção i.p. de veículo), quando comparados aos seus controles (veículo + salina) (ANOVA dois critérios;  $F_{(3,$

47) interação = 2,23 ,  $p = 0,096$ ;  $F_{(1, 47)} \text{ estímulo} = 10,84$ ,  $p = 0,001$ ;  $F_{(3, 47)} \text{ tratamento} = 0,895$ ,  $p = 0,45$ ; pós-teste de Tukey) (Figura 11B). Não notamos diferença significativa no pós-teste para essa variável entre os grupos injetados FK506 e que receberam NMDA com seus respectivos grupos controle.

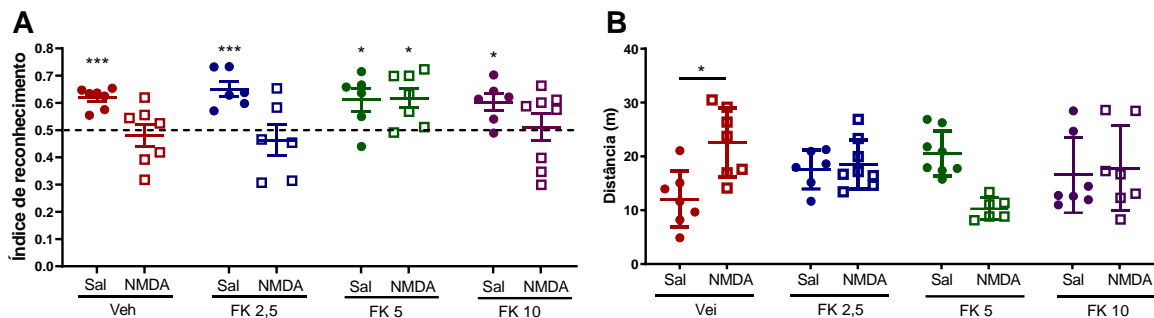


Figura 11: Efeitos do tratamento com FK506 sobre a tarefa de reconhecimento de objeto no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA. Índice de reconhecimento de objetos (A) e distância total percorrida (B). N (Veh + Sal = 7, Veh + NMDA = 7, FK2,5 + Sal = 6, FK2,5 + NMDA = 6, FK5 + Sal = 6; FK5 + NMDA = 7, FK10 + Sal = 6, FK10 + NMDA = 8). \* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.3. O FK506 não impediu a marcação por FJC e a perda neuronal induzidas por NMDA

Tendo em mente os resultados obtidos a partir da TRO, decidimos investigar o impacto do FK506 sobre o processo neurodegenerativo no hipocampo. Nesse sentido, a avaliação por meio da coloração de FJC demonstrou, inicialmente, que o NMDA é capaz de induzir marcação por FJC tanto no GD quanto em CA1 do hipocampo 24 h após a microinjeção intrahipocampal (Figura 12C). Para avaliar o efeito do FK506, geramos o delta ( $\Delta$ ) entre indivíduos que receberam NMDA e aqueles que receberam salina. Indivíduos que receberam injeção i.p. de veículo e microinjeção de NMDA apresentam área marcada por FJC maior do que indivíduos que receberam salina, evidenciado pelo valor positivo de  $\Delta$ . As doses de 5 ou 10 mg/kg não alteraram esse perfil no GD (ANOVA um critério,  $F_{(2, 13)} = 1,328$ ,  $p = 0,298$ ) (Figura 12A e C) ou em CA1 (ANOVA um critério,  $F_{(2, 12)} = 2,281$ ,  $p = 0,144$ ) (Figura 12B e C). Não foi possível avaliar os hipocampus de animais submetidos ao tratamento com a dose de 2,5 mg/kg, seguido por microinjeção de NMDA, devido à pouca integridade do tecido obtido a partir desses indivíduos.

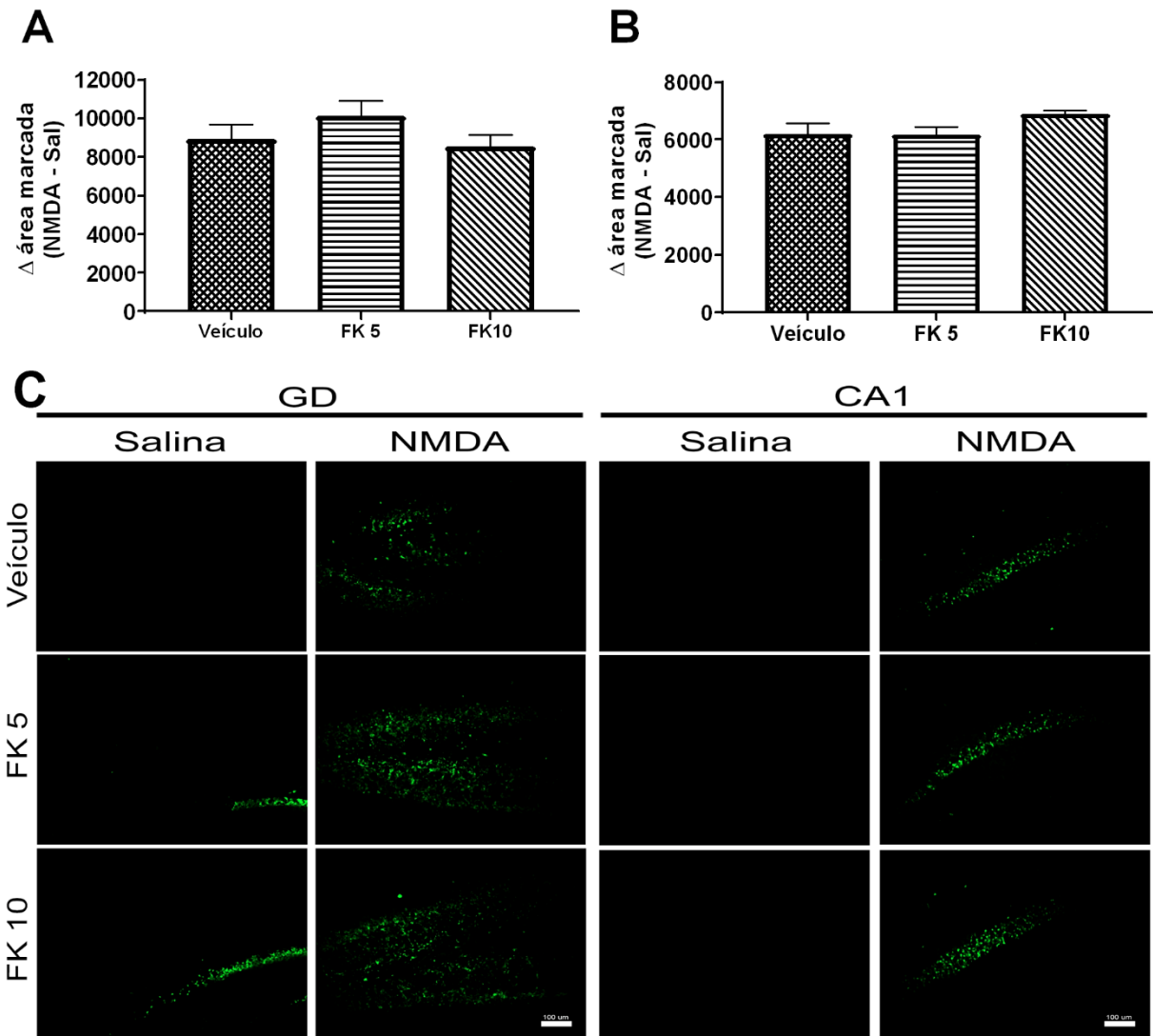


Figura 12: Efeitos do tratamento com FK506 sobre colocação por FJC no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA. Delta para área ocupada por FJC no GD (A) e em CA1 (B) e fotomicrografias representativas da coloração por FJC no DG ou em CA1 do hipocampo (C). Objetiva de 20X. Escala 100  $\mu$ m.

Somado a isso, quantificamos a densidade óptica da imunomarcção por NeuN com objetivo de avaliar a perda neuronal induzida por NMDA e o impacto do inibidor da calcineurina sobre essa perda. O NMDA reduziu a densidade óptica na camada granular do GD, no entanto o FK506 não foi capaz de impedir o efeito induzido por NMDA [ANOVA dois critérios;  $F_{(2, 22)}$  interação = 1,002,  $p = 0,38$ ;  $F_{(1, 22)}$  estímulo = 56,59,  $p < 0,0001$ ;  $F_{(2, 22)}$  tratamento = 1,915,  $p = 0,17$ ; pós-teste de Tukey] (Figura 13A e C). O mesmo impacto pelo estímulo com NMDA foi percebido na camada piramidal de CA1 e, mais uma vez, não houve efeito do FK506 [ANOVA dois critérios;  $F_{(2, 24)}$  interação = 1,453,  $p = 0,616$ ;  $F_{(1, 24)}$  estímulo = 87,68,  $p < 0,0001$ ;  $F_{(2, 24)}$  tratamento = 1,133,  $p = 0,33$ ; pós-teste de Tukey] (Figura 13B e C).

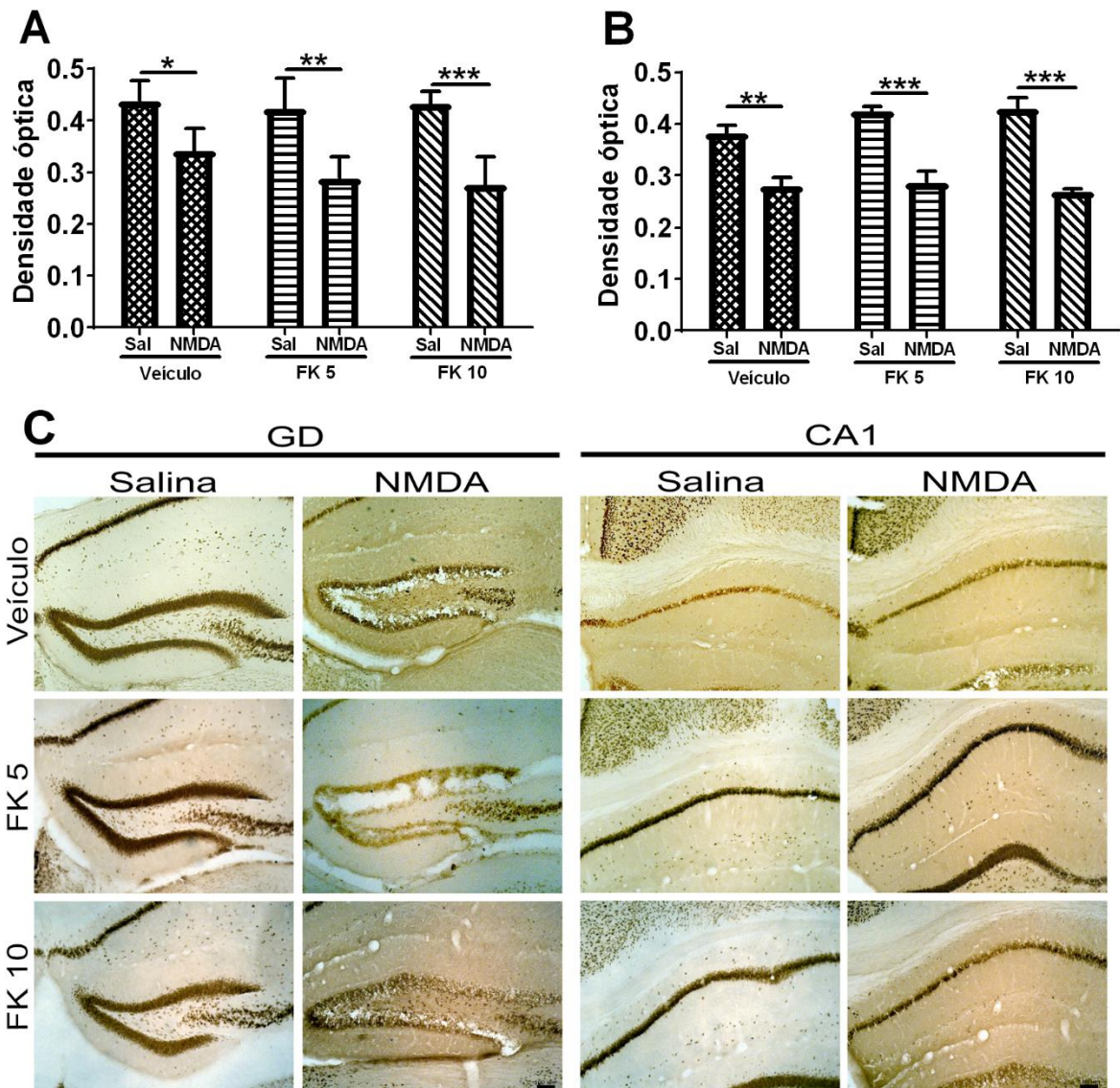


Figura 13: Efeitos do tratamento com FK506 sobre a imunomarcção por NeuN no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA. Densidade óptica da imunomarcção por NeuN no GD (A) e em CA1 (B) e fotomicrografias representativas da imunomarcção por NeuN no GD e em CA1 do hipocampo (C). N (Vei + Sal = 6, Vei + NMDA = 5, FK5 + Sal = 4; FK5 + NMDA = 6, FK10 + Sal = 4, FK10 + NMDA = 5) Objetiva de 10X. Escala 100  $\mu$ m.

#### 4.4. O FK506, mas não o NMDA, alterou o número de células Iba-1-positivas

Para testar o possível efeito do estímulo com NMDA sobre o perfil microglial no hipocampo, estimamos a quantidade de células Iba-1-positivas totais, não ameboides e ameboides. Considerando também o efeito imunossupressor do FK506, decidimos testar a hipótese de que essa droga reduziria a ativação microglial induzida por NMDA.

A microinjeção de NMDA não alterou o número de células Iba-1-positivas totais ou não ameboides, em comparação ao estímulo com salina, em animais pré-tratados

com veículo (Figura 14A e B). No entanto, observamos a presença de células ameboides no GD de indivíduos microinjetados com NMDA, mas não nos animais que receberam apenas salina (Figura 14C e D). Também é importante mencionar que encontramos células ameboides em indivíduos pré-tratados com as doses de 5 ou 10 mg/kg de FK506 e que receberam salina (Figura 14C e D). Além disso, o FK 5 mg/kg por si só induziu aumento no número de micróglia total [ANOVA dois critérios;  $F_{(2, 15)}$  Interação = 5,479,  $p = 0,016$ ;  $F_{(1, 15)}$  estímulo = 1,324,  $p = 0,26$ ;  $F_{(2, 15)}$  tratamento = 5,829,  $p = 0,013$ ; pós-teste de Tukey] e não ameboides [ANOVA dois critérios;  $F_{(2, 17)}$  interação = 4,333,  $p = 0,030$ ;  $F_{(1, 17)}$  estímulo = 0,099,  $p = 0,75$ ;  $F_{(2, 17)}$  tratamento = 2,191,  $p = 0,142$ ; pós-teste de Tukey] (Figura 14A e B). No entanto, as doses de 5 ou 10 mg/kg de FK506 não foram capazes de alterar o perfil microglial em indivíduos que receberam NMDA, em comparação aos que receberam salina.



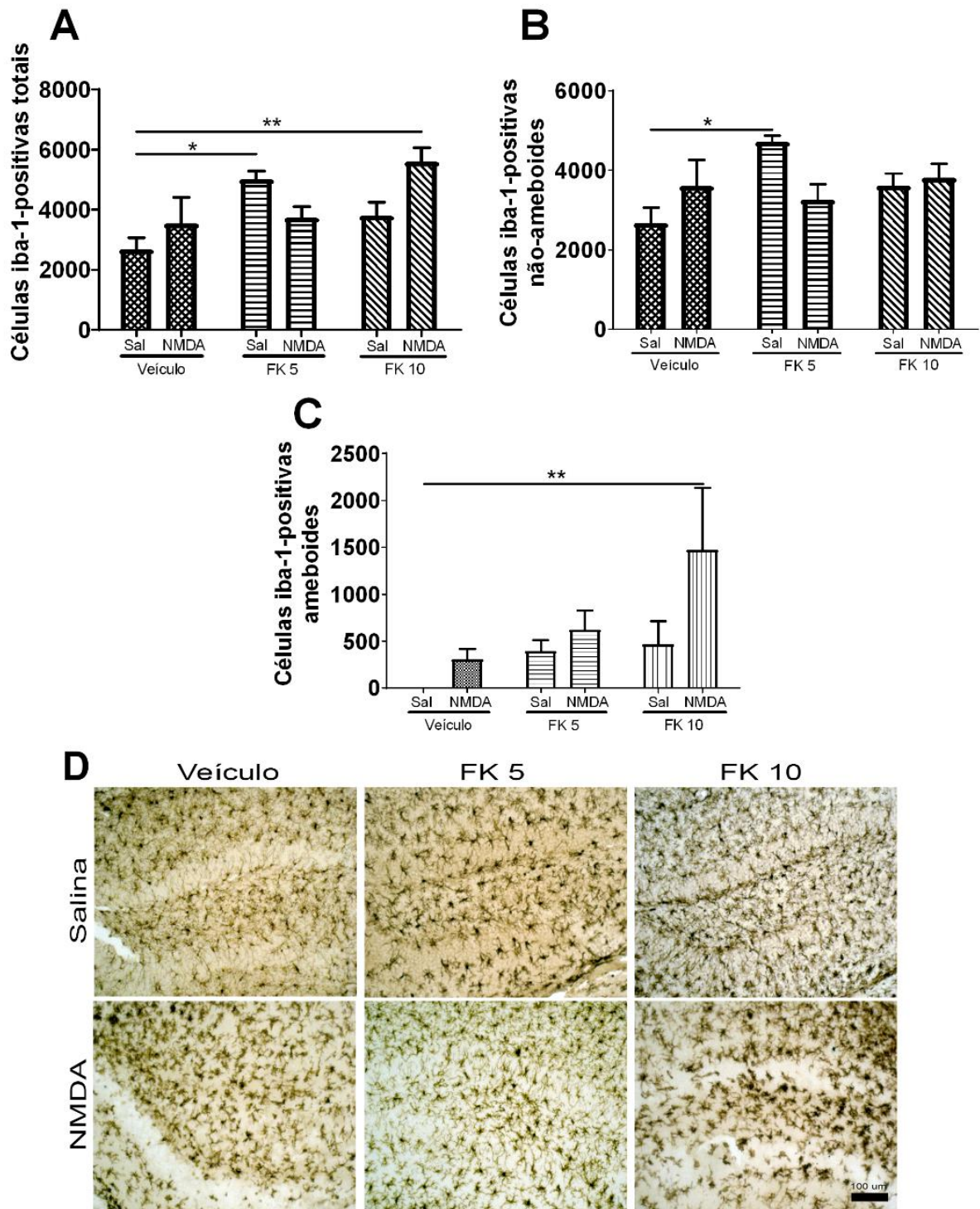


Figura 14: Efeitos do tratamento com FK506 sobre perfil microglial na camada polimórfica do GD do hipocampo no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA. Estimativa do número total de células Iba-1-positivas (A), de células Iba-1-positivas não ameboides (B) e do número de células Iba-1-positivas ameboides (C) e fotomicrografias representativas da imunomarcagem por Iba-1 no GD do hipocampo (D). N (Vei + Sal = 4, Vei + NMDA = 4, FK5 + Sal = 4; FK5 + NMDA = 4, FK10 + Sal = 4, FK10 + NMDA = 4). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . Objetiva de 20X. Escala = 100  $\mu\text{m}$ .

#### **4.5. O FK506 impediu a alteração na fosforilação de Erk<sub>1/2</sub> no hipocampo, mas não de Akt, induzidas por NMDA 24 horas após a microinjeção**

Considerando o efeito protetor de FK506 percebido em TRO, resolvemos avaliar vias envolvidas em processos de sobrevivências celular. Não observamos efeito do estímulo com NMDA ou do tratamento com FK506 sobre os níveis de fosforilação de Akt 30 minutos após a microinjeção (Figura 15A e C e Anexo E). No entanto, NMDA induziu a fosforilação de Akt 24 horas após a microinjeção, sendo que esse efeito não foi impedido pela dose de 5 mg/kg de FK506 [ANOVA um critério;  $F_{(3, 14)} = 6,061$ ,  $p = 0,0073$ ; pós-teste de Sidak). Quanto aos níveis de fosforilação de Erk<sub>1/2</sub>, não houve alteração nos níveis de fosforilação dessa proteína em qualquer um dos grupos experimentais 30 minutos após a microinjeção (Figura 15E e G e Anexo E). Por outro lado, houve uma tendência de redução nos níveis de fosforilação de Erk<sub>1/2</sub> induzida por NMDA no tempo de 24 horas [ANOVA um critério,  $F_{(3, 14)} = 5,637$ ,  $p = 0,0095$ ; pós-teste de Tukey], o que não foi percebido em animais pré-tratados com 5 mg/kg de FK506 (Figura 15F e H e Anexo E)

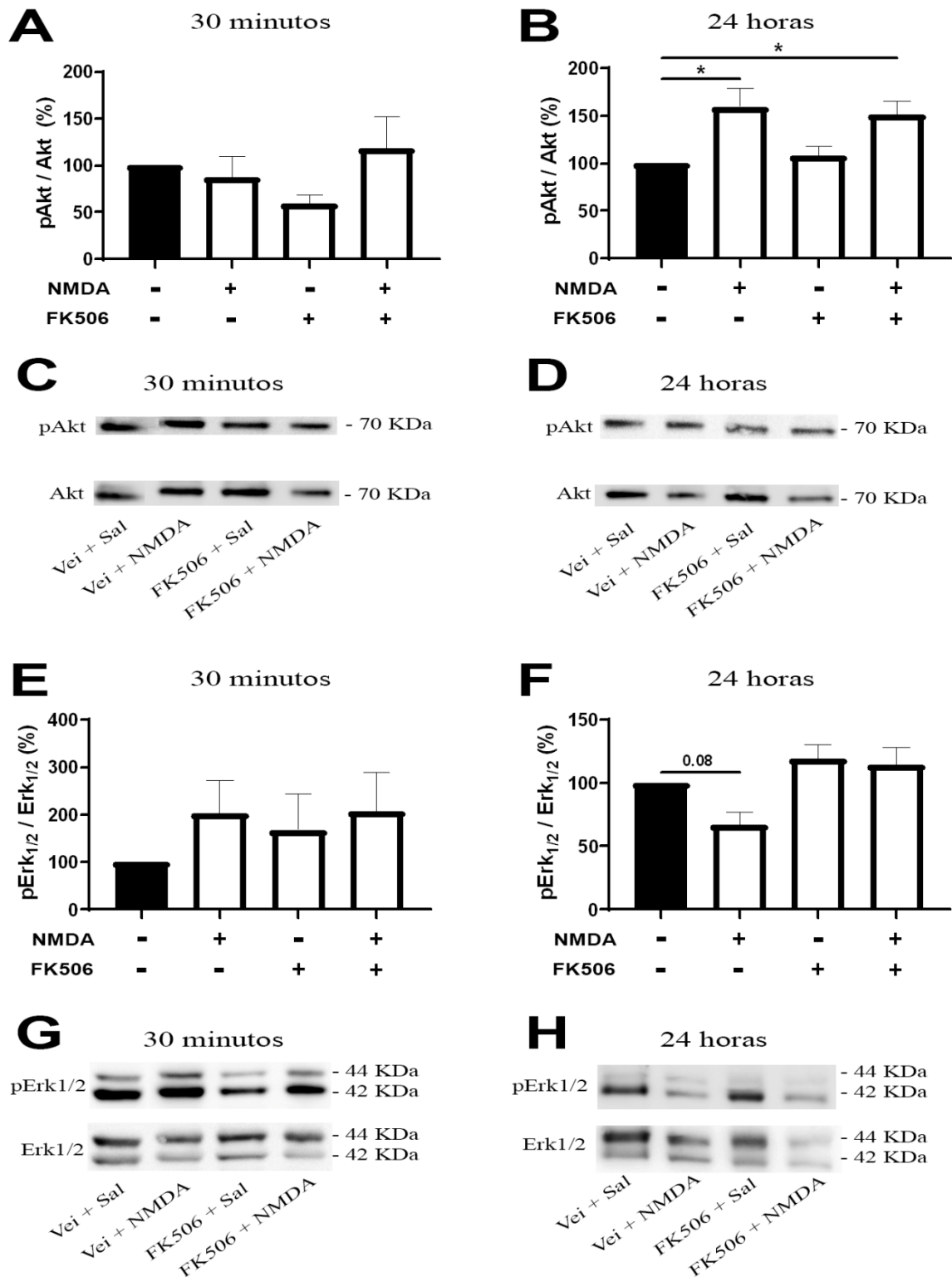


Figura 15: Efeitos do tratamento com FK506 (5 mg/kg) sobre a fosforilação de Akt e Erk no modelo de microinjeção intrahipocampal de NMDA. Níveis de fosforilação de Akt 30 minutos (A) e 24 horas (B) após a microinjeção e imagens representativas de Akt fosforilada e total 30 minutos (C) e 24 horas (D) após a microinjeção. Níveis de fosforilação de Erk 30 minutos (E) e 24 horas (F) após a microinjeção e imagens representativas de Erk fosforilada e total 30 minutos (G) e 24 horas (H) após a microinjeção. N (Vei + Sal = 5, Vei + NMDA = 5, FK5 + Sal = 5, FK5 + NMDA = 5). \*  $p < 0,05$ .

#### 4.6. NMDA reduziu a expressão de NeuN em culturas organotípicas, mas não em culturas pré-tratadas com FK506

Com o objetivo de avaliar de forma mais profunda os efeitos do FK506 sobre as consequências induzidas pelo NMDA, usamos o modelo de cultura organotípicas de fatias de hipocampo. A avaliação por meio de PCR quantitativo demonstrou menor expressão de NeuN em culturas normais estimuladas com NMDA na ausência de FK506, mas não em culturas tratadas apenas com FK506 ou tratadas com FK506 e estimuladas com NMDA (Kruskal-Wallis,  $p = 0.017$ ; pós-teste de Dunn) (Figura 16).

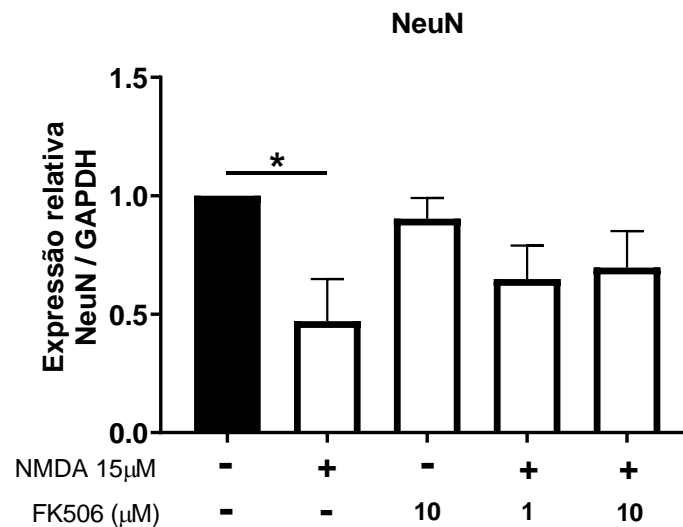


Figura 16: Efeitos do tratamento com FK506 sobre a expressão de NeuN em culturas organotípicas estimuladas com NMDA. N = 3. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.7. O NMDA não alterou a expressão de Iba-1, GFAP ou TNF- $\alpha$ em culturas organotípicas

O PCR quantitativo revelou a ausência de alteração na expressão de Iba-1 (Figura 17A e Anexo F) ou de TNF (Figura 17B e Anexo F) induzida por NMDA ou por FK506. NMDA ou FK506 sozinhos não alteraram a expressão de TNF-  $\alpha$ , mas houve aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em culturas tratadas com 1 ou 10  $\mu$ M de FK506 e estimuladas com NMDA (Kruskal-Wallis,  $p = 0,033$ ; pós-teste de Dunn) (Figura 17B).

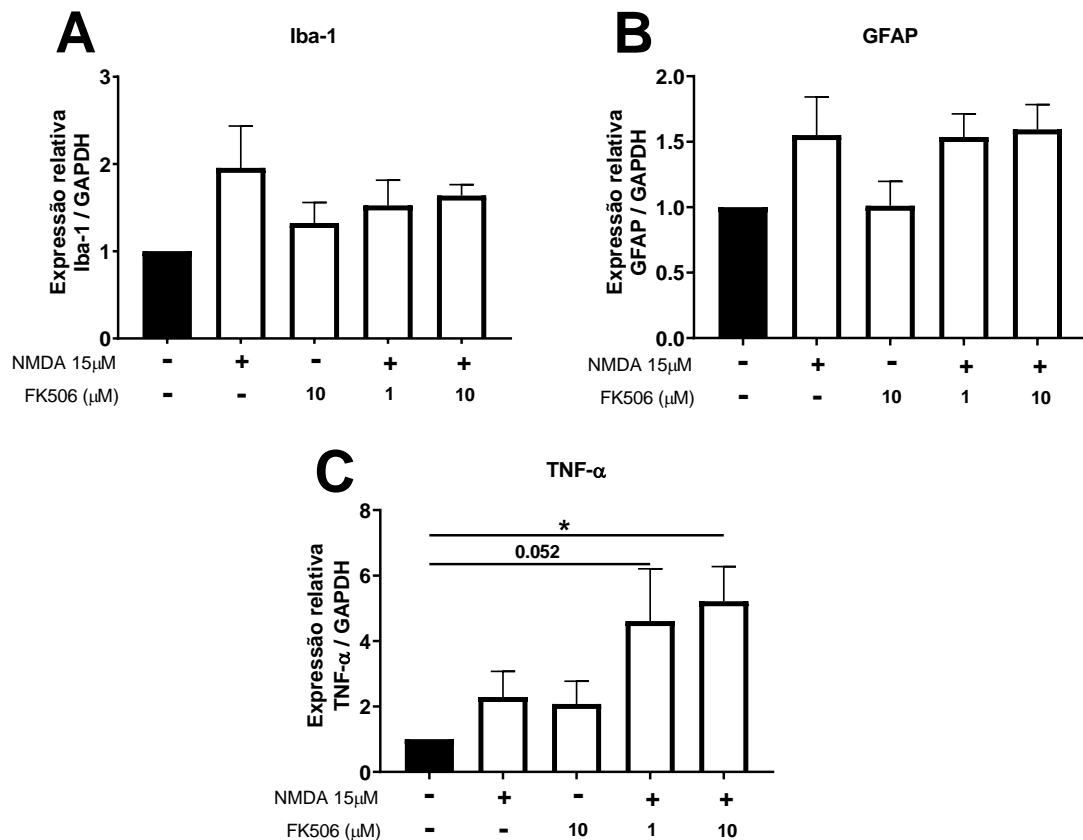


Figura 17: Efeitos do tratamento com FK506 sobre a expressão Iba-1, GFAP e TNF- $\alpha$  em culturas organotípicas estimuladas com NMDA. Expressão de Iba-1 (A), GFAP (B) e TNF- $\alpha$  (C) em culturas organotípicas. N = 3. \* p < 0,05.

#### 4.8. O NMDA não alterou a expressão de fatores neurotróficos em culturas organotípicas

Sabendo do papel importante dos fatores neurotróficos na sobrevivência neuronal, avaliamos a expressão de BDNF, NGF e TGF $\beta$ . O estímulo com NMDA sozinho não foi capaz de induzir alteração da expressão dos fatores neurotróficos BDNF, NGF ou TGF $\beta$  (Figura 18A – C e Anexo F). No entanto, o PCR quantitativo revelou uma tendência no aumento da expressão de NGF culturas tratadas com 1 ou 10  $\mu$ M de FK506 e estimuladas com NMDA (Kruskal-Wallis, p = 0.07) (Figura 18B). Além disso, houve aumento na expressão de TGF $\beta$  em culturas tratados com 10  $\mu$ M de FK506 e estimuladas com NMDA, além de uma tendência de aumento de expressão em culturas tratadas com 1  $\mu$ M de FK506 e estimuladas com NMDA (Kruskal-Wallis, p = 0,039; pós-teste de Dunn) (Figura 18C).

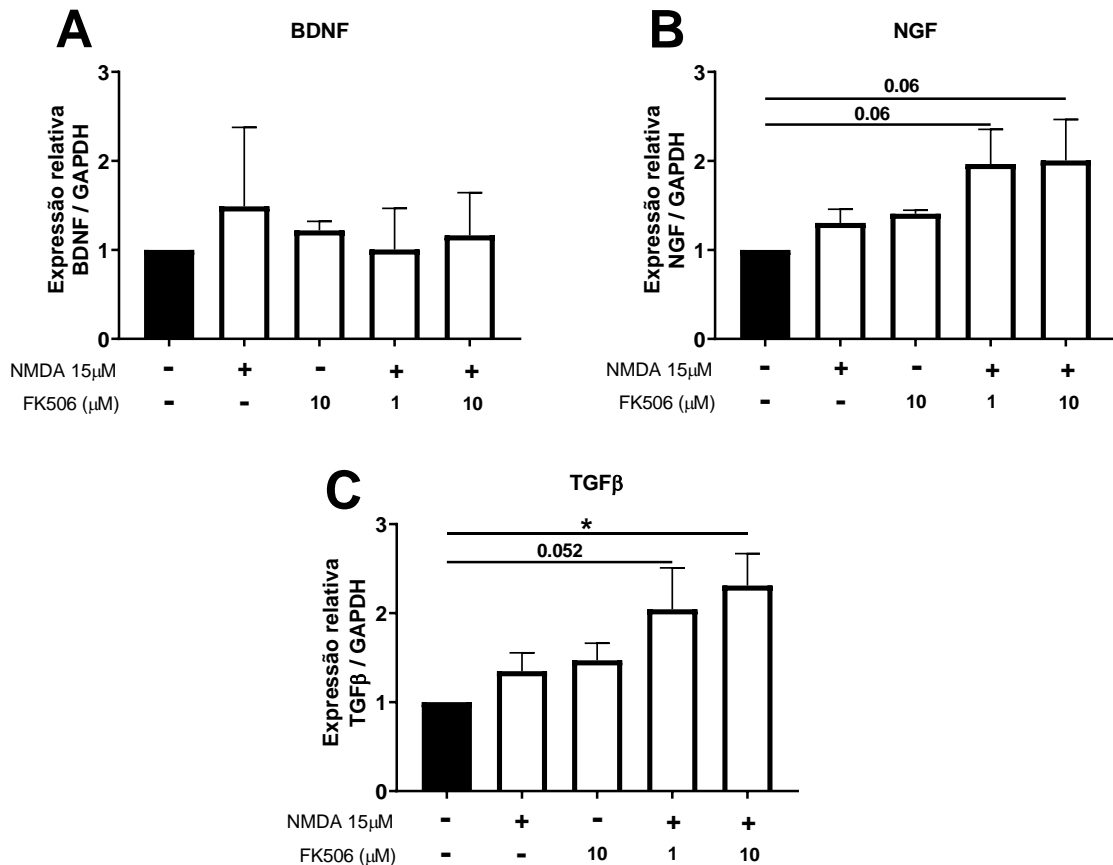


Figura 18: Efeitos do tratamento com FK506 sobre a expressão de fatores neurotróficos em culturas organotípicas estimuladas com NMDA. Expressão de BDNF (A), NGF (B) e TGFβ (C) em culturas organotípicas. N = 3. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.9. O NMDA não alterou a expressão de NeuN ou de GFAP em culturas organotípicas depletadas

Com o objetivo de avaliar a participação da micróglia na neurotoxicidade induzida por NMDA, parte das culturas foram tratadas com clodronato dissódico para depleção da micróglia e submetidos ao mesmo modelo de tratamento do FK506 e estímulo com NMDA.

De modo diferente ao observado em culturas organotípicas que continham micróglia, NMDA não alterou a expressão de NeuN ou GFAP na ausência dessas células da glia (Figura 19A - B). Em culturas organotípicas depletadas, a quantificação da expressão de Iba-1 e de TNF- $\alpha$  por RT-qPCR foi baixa, como esperado, e por isso não foram mostradas no presente relato.

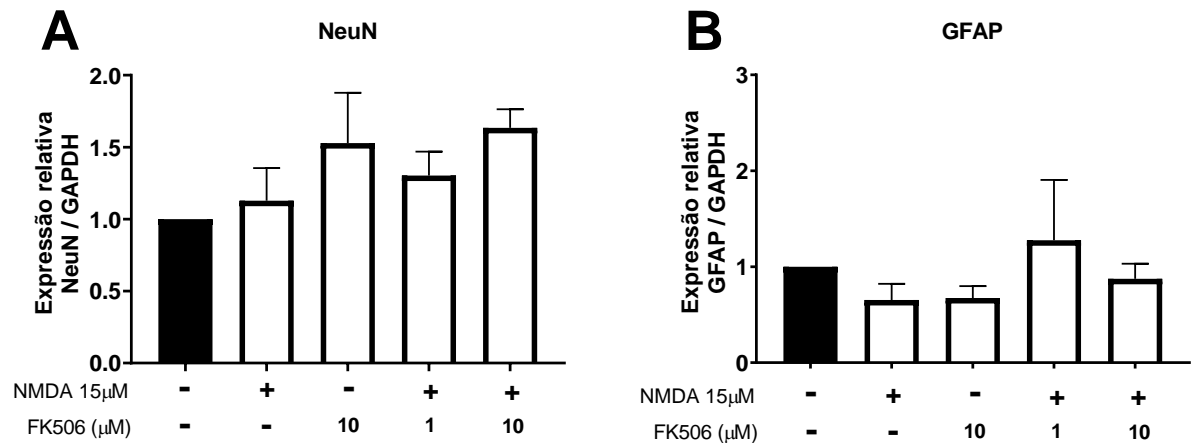


Figura 19: Efeitos da depleção da micrógliia e do tratamento com FK506 sobre a expressão de NeuN (A) e GFAP (B) em culturas organotípicas depletadas estimuladas com NMDA. N = 3. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.10. Houve uma tendência de aumento na expressão de BDNF em culturas depletadas e estimuladas com NMDA, mas não em culturas tratadas com FK506

Houve uma tendência de aumento na expressão de BDNF em culturas depletadas estimuladas com NMDA, o que não foi percebido em culturas depletadas tratadas com FK506 e estimuladas com NMDA (Kruskal-Wallis,  $p = 0,07$ ) (Figura 20).

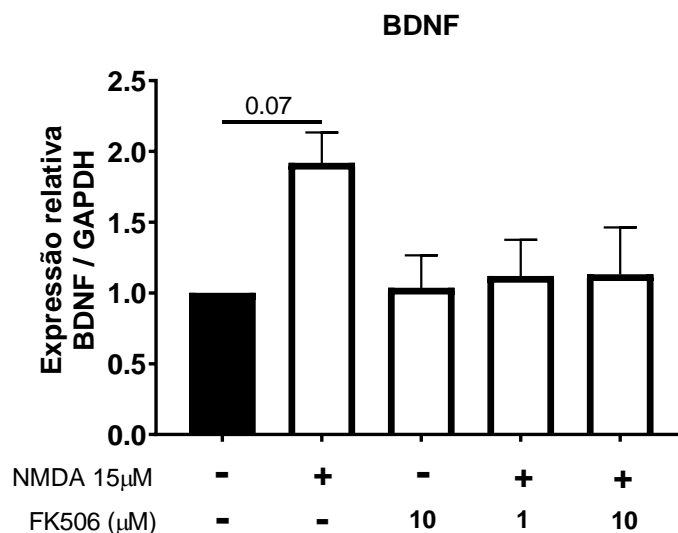


Figura 20: Efeitos do tratamento com FK506 e da depleção da micrógliia sobre a expressão de BDNF em culturas organotípicas de fatias de hipocampo estimuladas com NMDA. N = 3.

#### 4.11. O NMDA não alterou a expressão de NGF e TGF $\beta$ em culturas depletadas

Não houve efeito do estímulo com NMDA ou do tratamento com FK506 sobre a expressão de NGF (Figura 21A e Anexo G). Apesar de o estímulo com NMDA não ter alterado a expressão de TGF $\beta$ , o PCR quantitativo revelou um aumento na expressão de TGF $\beta$  em culturas tratadas com 10  $\mu$ M de FK506 e estimuladas com NMDA (Kruskal-Wallis,  $p = 0,02$ ; pós-teste de Dunn) (Figura 21B).

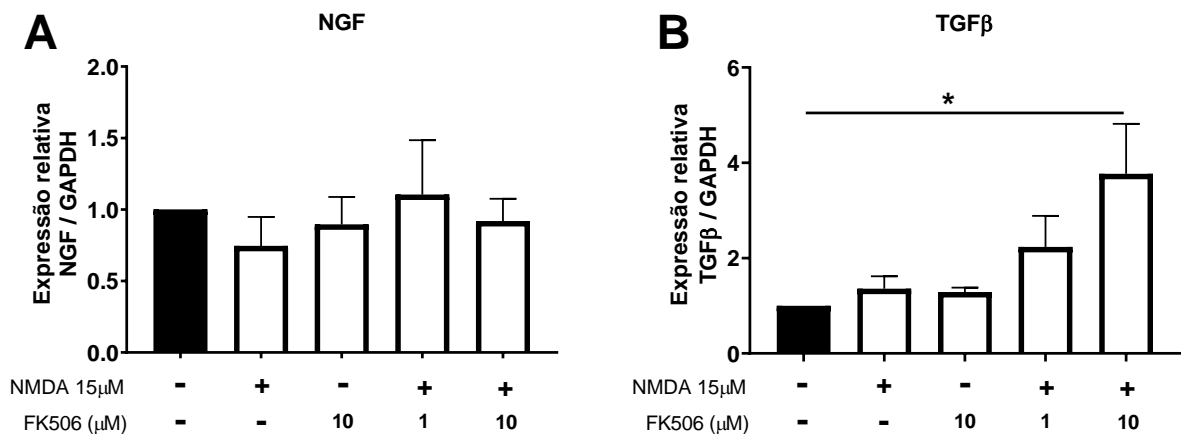


Figura 21: Efeitos do tratamento com FK506 e da depleção da micróglia sobre a expressão de NGF (A) e TGF $\beta$  (B) em culturas organotípicas depletadas estimuladas com NMDA. N = 3. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.12. O FK506 não alterou a expressão de genes envolvidos em estresse oxidativo ou em apoptose em culturas organotípicas normais ou em culturas organotípicas depletadas

Com o objetivo de avaliar quais mecanismos intracelulares podem estar mais amplamente associados aos efeitos de NMDA e FK506 em culturas normais ou depletadas, testamos a expressão SOD1, SOD2, Bcl-2 e Bad, proteínas envolvidas em processo de estresse oxidativo e morte celular (KOLE; ANNIS; DESHMUKH, 2013; KRISTIANSEN; HAM, 2014; M *et al.*, 2014). Não percebemos efeito do estímulo com NMDA ou do tratamento com FK506 sobre a expressão desses genes em culturas organotípicas normais ou em culturas organotípicas alteradas (Figura 22A – H e Anexos F e G).



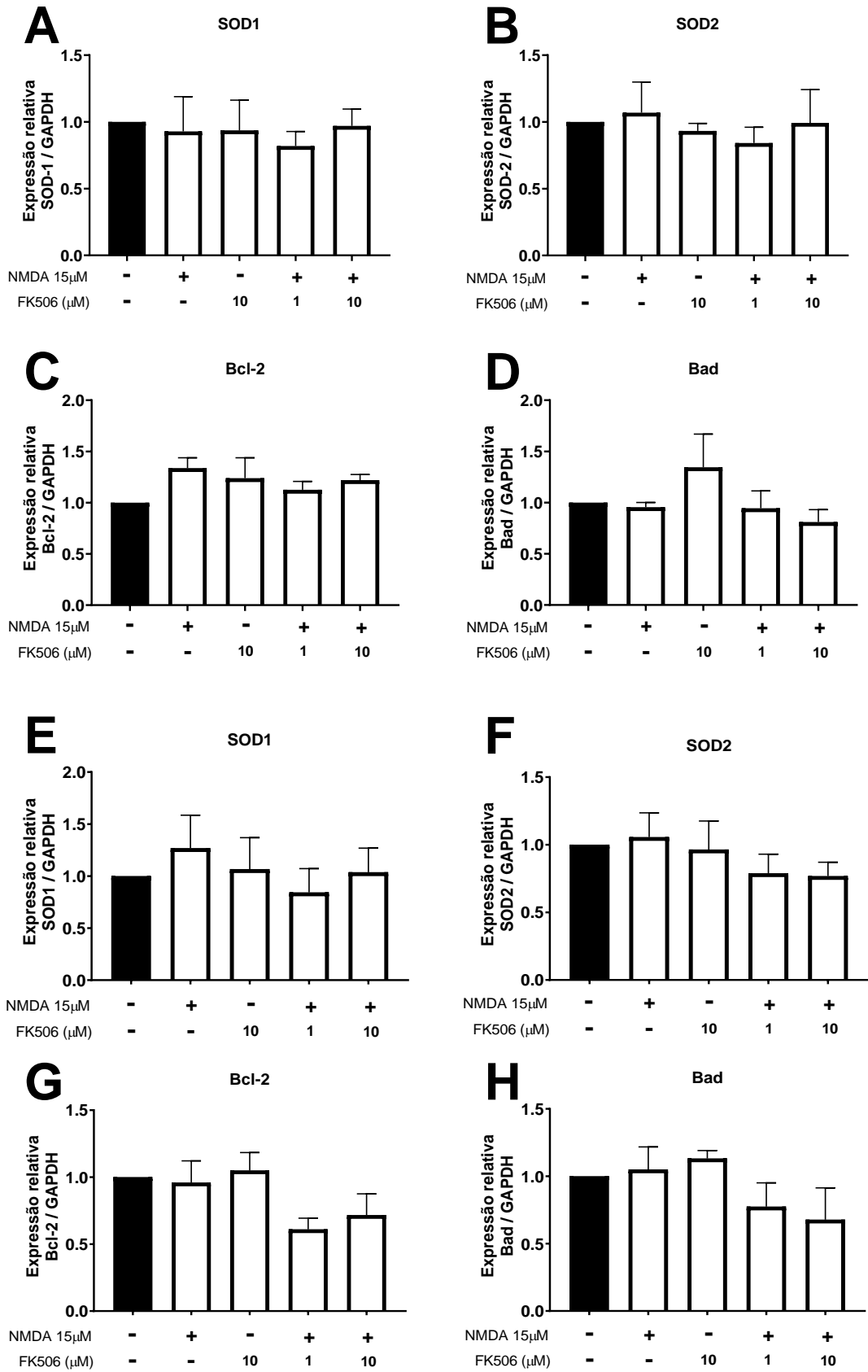


Figura 22: Expressão de fatores associados a estresse oxidativo e apoptose em culturas organotípicas de fatias de hipocampo normais ou depletadas. Expressão de SOD1 (A), SOD2 (B), Bcl-2 (C) e Bad (D) em culturas organotípicas normais. Expressão de SOD1 (E), SOD2 (F), Bcl-2 (G) e Bad (H) em culturas organotípicas depletadas. N = 3.

#### 4.13. O FK506 impediu o comprometimento cognitivo induzido por A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Considerando que a hipótese amiloide-beta é uma das hipóteses mais bem aceitas acerca da patogênese de DA, nós utilizamos o modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Além disso, avaliamos os efeitos do FK506 no modelo de neurotoxicidade proposto. De modo parecido ao encontrado para o modelo de microinjeção de NMDA, animais que receberam A $\beta$  (precedido por veículo) não foram capazes de reconhecer o objeto novo (teste t para uma amostra,  $t_{(6)} = 1,635$ ,  $p=0,15$ ), evidenciando o comprometimento na TRO (Figura 23A). Por outro lado, animais que receberam injeção i.p. de veículo e microinjeção de salina foram capazes de distinguir o objeto novo (teste t para uma amostra,  $t_{(6)} = 4,028$ ,  $p=0,006$ ). Ainda de modo semelhante ao modelo anterior, a dose de 5 mg/kg de FK506 foi capaz de evitar o déficit cognitivo encontrado em animais não tratados (teste t para uma amostra,  $t_{(7)} = 3,847$ ,  $p = 0,006$ ), mas as doses de 2,5 e 10 mg/kg não tiveram mesmo efeito (Figura 23A e Anexo H). O pré-tratamento com FK506, seguido de microinjeção de salina, não induziu comprometimento cognitivo no paradigma avaliado. Não notamos diferença na distância total percorrida entre qualquer um dos grupos experimentais avaliados no teste (Figura 23B e Anexo H).

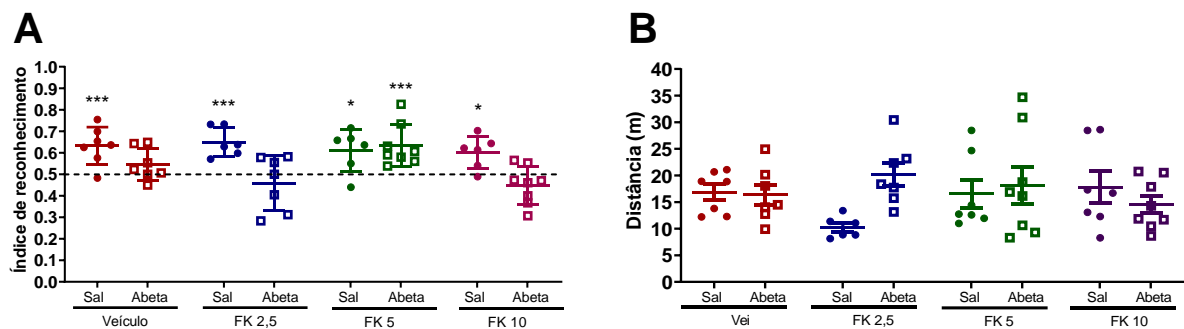


Figura 23: Efeitos do tratamento com FK506 sobre a tarefa de reconhecimento de objeto no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ . Índice de reconhecimento de objetos (A) e distância total percorrida (B). N (Vei + Sal = 7, Vei + A $\beta$  = 7, FK2,5 + Sal = 6, FK2,5 + A $\beta$  = 7, FK5 + Sal = 6, FK5 + A $\beta$  = 8, FK10 + Sal = 6, FK10 + A $\beta$  = 8). \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.14. O FK506 impediu a marcação por FJC induzida por A $\beta$ <sub>1-42</sub>

A microinjeção de A $\beta$  induziu marcação por FJC no GD e em CA1 do hipocampo (Figura 24A - C). Por outro lado, as doses de 5 e 10 mg/kg de FK506 foram capazes de reduzir significativamente a marcação por FJC no GD de animais que receberam A $\beta$  (ANOVA um critério,  $F_{(2, 17)} = 8,283$ ,  $p = 0,003$ ; pós-teste de Tukey) (Figura 24A e C). Além disso, houve uma tendência de redução dos valores de  $\Delta$  em

CA1 em indivíduos que receberam 5 mg/kg de FK506 [ANOVA um critério,  $F_{(2, 17)} = 3,191$ ,  $p = 0,066$ ] (Figura 24B).

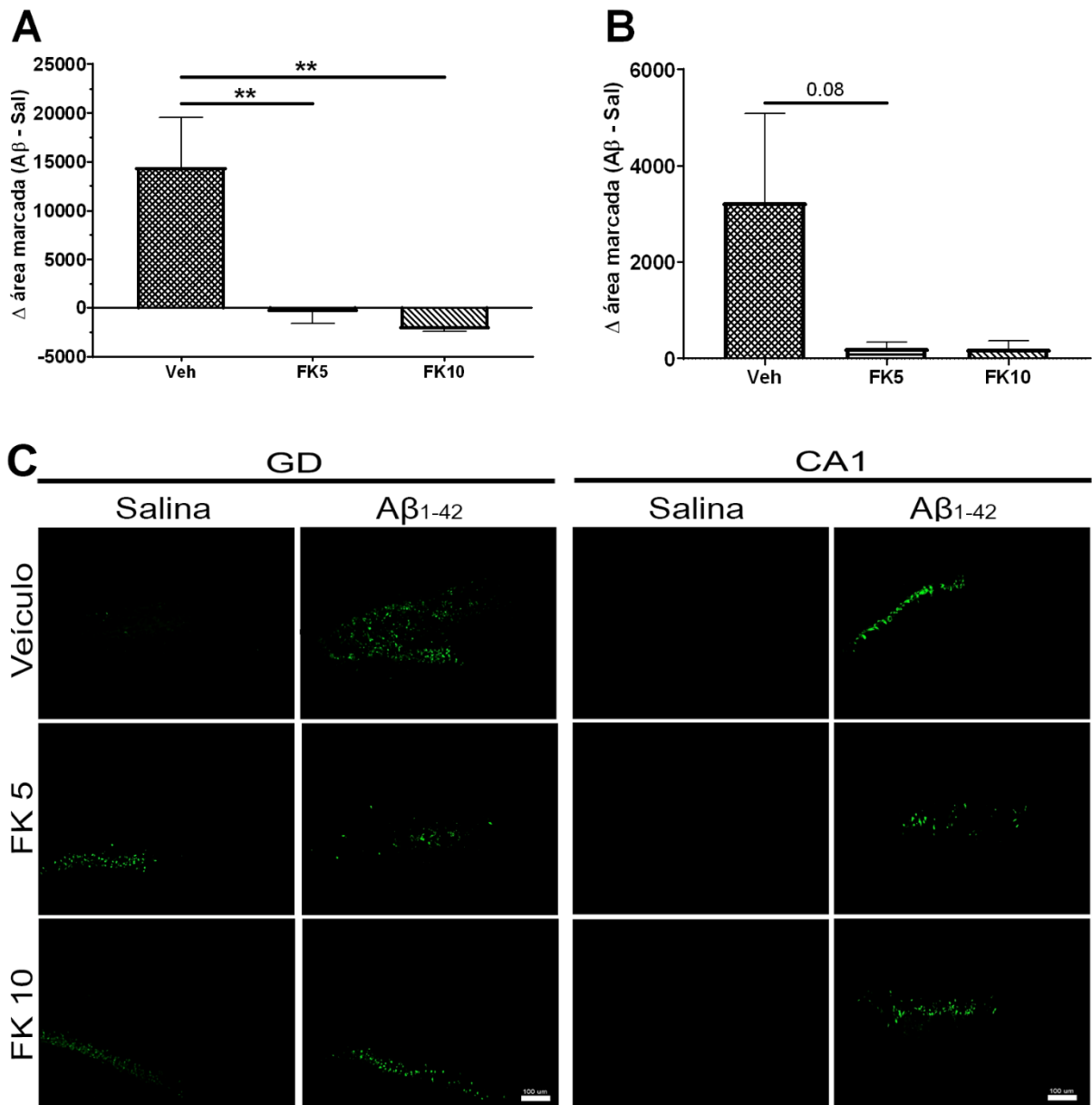


Figura 24: Efeitos do tratamento com FK506 sobre colocação por FJC no modelo de microinjeção intrahipocampal de Aβ. Delta para área ocupada por FJC no GD (A) e em CA1 (B) e fotomicrografias representativas da coloração por FJC no DG ou em CA1 do hipocampo (C). Objetiva de 20X. Escala 100 μm. \*\*  $p < 0,01$ . Objetiva de 20X. Escala 100 μm.

#### 4.15. O Aβ<sub>1-42</sub> não induziu perda neuronal

Apesar da presença de marcação de FJC nas duas regiões do hipocampo avaliadas no presente trabalho, não observamos alteração na densidade óptica da imunomarcagem por NeuN induzida por Aβ em qualquer uma das regiões (Figura 25A – C e Anexo I). Também não houve qualquer efeito do FK506 sobre a

imunomarcaco por NeuN em indivíduos microinjetados com A $\beta$  ou em indivíduos que receberam salina apenas (Figura 25A – C e Anexo I).

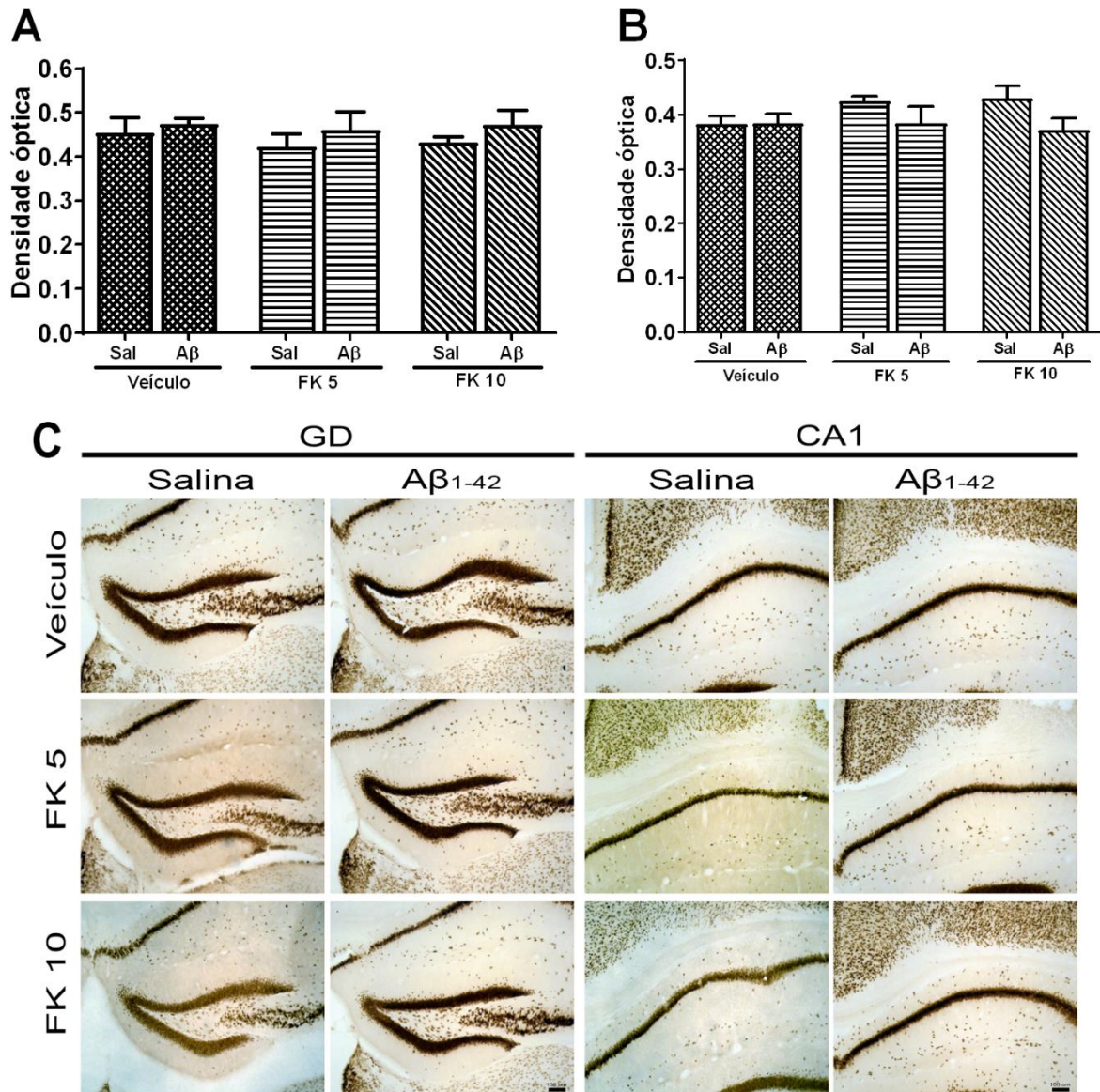


Figura 25: Efeitos do tratamento com FK506 sobre a imunomarcaco por NeuN no GD e em CA1 do hipocampo no modelo de microinjeco intrahipocampal de A $\beta$ . Densidade ptica da imunomarcaco por NeuN no GD (A) e em CA1 (B) e fotomicrografias representativas da imunomarcaco por NeuN no GD e em CA1 do hipocampo (C). N (Vei + Sal = 6, Vei + A $\beta$  = 5, FK5 + Sal = 4, FK5 + A $\beta$  = 5, FK10 + Sal = 4, FK10 + A $\beta$  = 5). Objetiva de 10X. Escala 100  $\mu$ m.

#### 4.16. O FK506 reduziu a microgliose induzida por A $\beta_{1-42}$

Para testar o possível efeito do estímulo com A $\beta$  sobre o perfil microglial no hipocampo, estimamos a quantidade de células iba-1-positivas totais, não ameboides e ameboides. Quanto ao perfil microglial no GD do hipocampo, a microinjeco de A $\beta$  aumentou o número de células iba-1-positivas totais [ANOVA dois critérios;  $F_{(2, 17)}$

interação = 9,639,  $p = 0,0016$ ;  $F_{(1, 17)}$  estímulo = 14,5,  $p = 0,0014$ ;  $F_{(2, 17)}$  tratamento = 5,056,  $p = 0,018$ ; pós-teste de Tukey], não-ameboides [ANOVA dois critérios;  $F_{(2, 17)} = 5,722$ ,  $p = 0,012$ ,  $F_{(1, 17)}$  estímulo = 2,812,  $p = 0,11$ ;  $F_{(2, 17)}$  tratamento = 3,192,  $p = 0,066$ ; pós-teste de Tukey] e ameboides [ANOVA dois critérios;  $F_{(2, 15)}$  interação = 2,642,  $p = 0,104$ ;  $F_{(1, 15)}$  estímulo = 13,67,  $p = 0,002$ ;  $F_{(2, 15)}$  tratamento = 0,053,  $p = 0,94$ ; pós-teste de Tukey] (Figura 26A - D). Também houve aumento no número de células totais e não ameboides em indivíduos que receberam 5 mg/kg de FK506 i.p. quando comparados ao grupo tratado com veículo apenas (Figura 26A e B). Mais uma vez, é preciso chamar atenção para a presença de células ameboides nos grupos que receberam 5 ou 10 mg/kg de FK506, seguida de microinjeção de salina. As doses de 5 ou 10 mg/kg de FK506 não alteraram o perfil microglial em indivíduos que receberam A $\beta$ , quando comparados aos que receberam salina (Figura 26A - C). Adicionalmente, a injeção i.p. de 10 mg/kg de FK506 impediu o aumento do número de células totais ou de células não amiloides induzidos pela microinjeção intrahipocampal de A $\beta$  (Figura 25A-B).

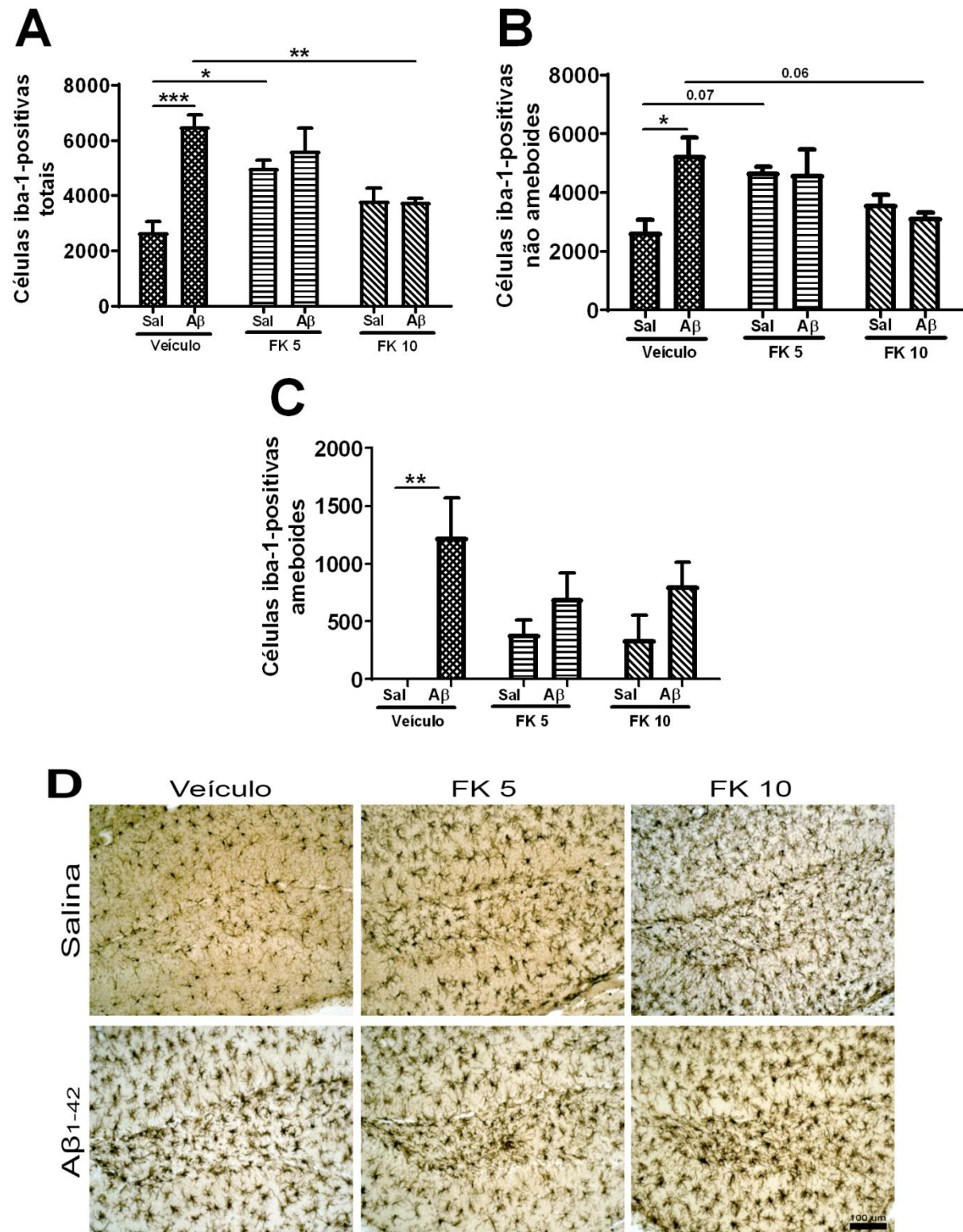


Figura 26: Efeitos do tratamento com FK506 sobre o perfil microglial na camada polimórfica do GD do hipocampo no modelo de microinjeção intrahipocampal de A $\beta$ . Estimativa do número total de células Iba-1-positivas (A), de células Iba-1-positivas não ameboides (B) e do número de células Iba-1-positivas ameboides (C) e fotomicrografias representativas da imunomarcagem por Iba-1 no GD do hipocampo (D). N (Vei + Sal = 4, Vei + A $\beta$  = 4, FK5 + Sal = 4, FK5 + A $\beta$  = 4, FK10 + Sal = 4, FK10 + A $\beta$  = 4). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . Objetiva de 20X. Escala = 100  $\mu$ m.

#### **4.17. O A $\beta$ não alterou os níveis de fosforilação de Erk e Akt**

Não observamos alteração nos níveis de fosforilação de Akt nos tempos de 30 minutos ou 24 horas após a microinjeção de A $\beta$  ou salina (Figura 27A – D e Anexo J). Igualmente, nenhuma alteração nos níveis de fosforilação de Erk foi percebida nesse modelo (Figura 27E – H e Anexo J). Além disso, a injeção i.p. de 5 mg/kg de FK506 não teve qualquer efeito sobre os níveis de fosforilação dessas duas proteínas em indivíduos microinjetados com A $\beta$  ou salina, em qualquer dos tempos avaliados.

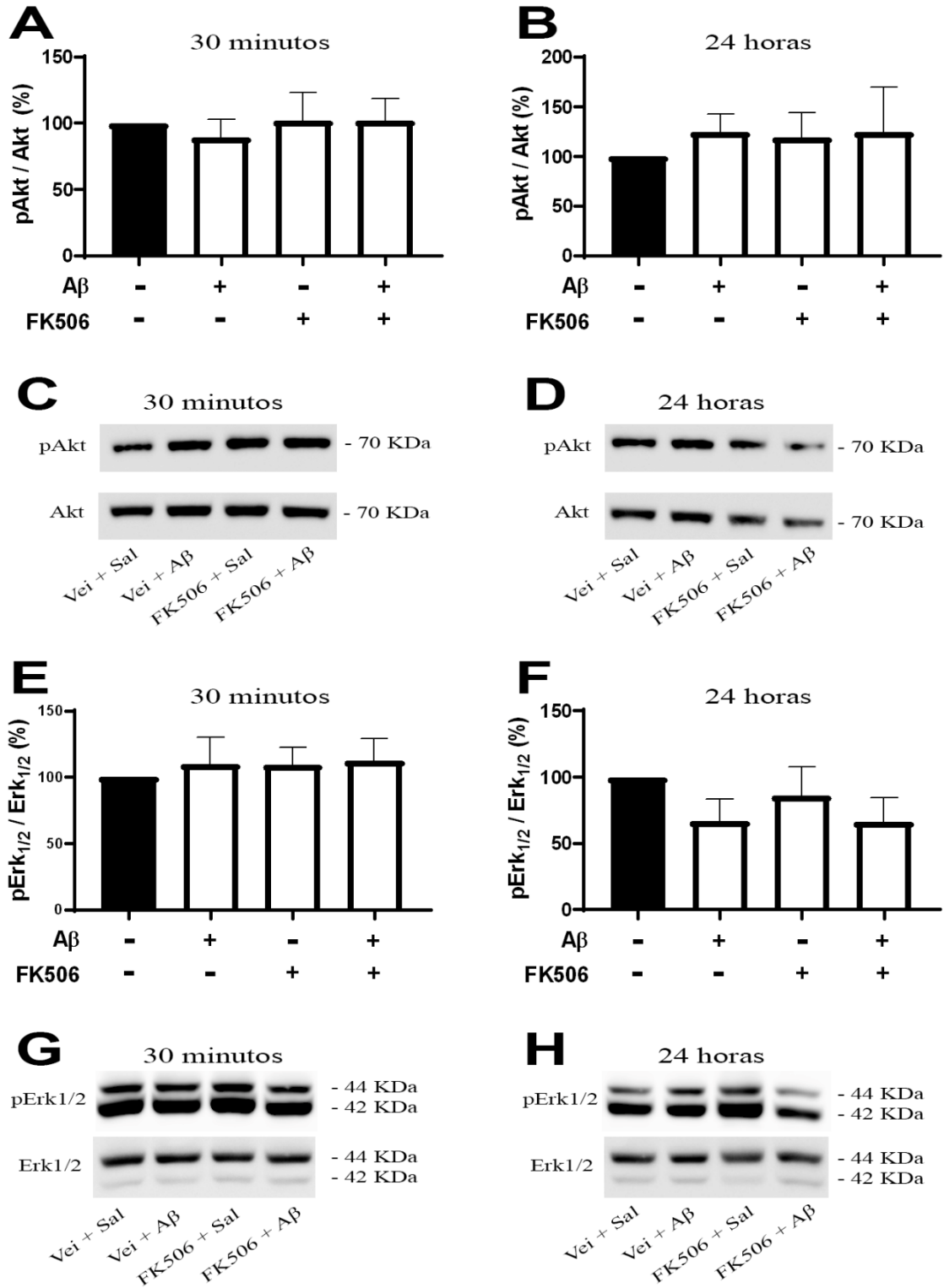


Figura 27: Efeitos do tratamento com FK506 (5 mg/kg) sobre a fosforilação de Akt e Erk no modelo de microinjeção intrahipocampal de Aβ. Níveis de fosforilação de Akt 30 min (A) e 24 h (B) após a microinjeção e imagens representativas de Akt fosforilada e total 30 min (C) e 24 h (D) após a microinjeção. Níveis de fosforilação de Erk 30 min (E) e 24 h (F) após a microinjeção e imagens representativas de Erk fosforilada e total 30 min (G) e 24 h (H) após a microinjeção. N (Vei + Sal = 4, Vei + Aβ = 4, FK5 + Sal = 4, FK5 + Aβ = 4).



#### 4.18. O tratamento crônico com FK506 não alterou a massa ou a mobilidade de animais TG ou WT *littermates*

Os modelos transgênicos representam característica histopatológicas, bioquímica e comportamentais que se assemelham a aquelas encontradas em paciente com DA e por isso são mais amplamente utilizados para a avaliação de potenciais tratamentos farmacológicos da doença. Nesse sentido, decidimos avaliar os efeitos do tratamento crônico com o inibidor da calcineurina FK506 em animais transgênicos APP/PS1, animais que mimetizam mais proximamente a forma familiar da DA e que tem como principal característica a amiloidose presente na condição patológica. Para isso, animais TG ou WT foram tratados por 30 dias com FK506 (5 mg/kg) ou veículo. Não percebemos alteração induzida pelo genótipo ou pelo tratamento na massa dos animais ao longo dos dias (Figura 28A). Também não houve interação ou impacto do genótipo na distância percorrida no CA, mas houve impacto do tratamento [ANOVA dois critérios;  $F_{(1, 28)} \text{ interação} = 0,4348$ ,  $p = 0,515$ ;  $F_{(1, 28)} \text{ tratamento} = 8,574$ ,  $p = 0,006$ ;  $F_{(1, 28)} \text{ genótipo} = 0,011$ ,  $p = 0,915$ ; Tukey pós-teste]. No entanto, não identificamos qualquer diferença entre os grupos experimentais no pós-teste (Figura 28B).

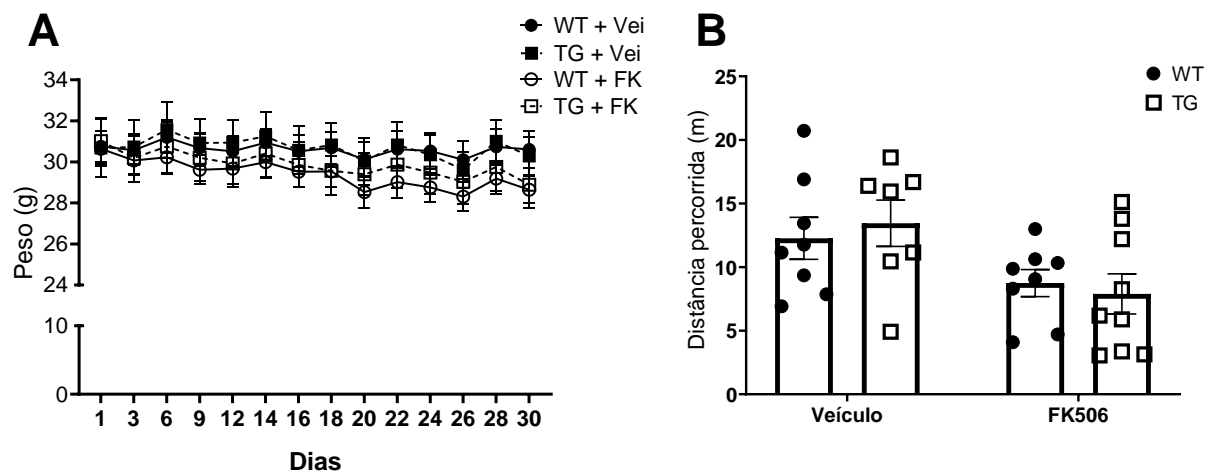


Figura 28: Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre a massa e a locomoção de animais TG ou WT. Massa dos indivíduos ao longo dos dias de tratamento (A) e distância percorrida no CA avaliada no dia 25 de tratamento (B). N (WT + Vei = 8, WT + FK506 = 8, TG + Vei = 9, TG + FK506 = 9).

#### 4.19. O tratamento crônico com FK506 reverteu o comprometimento do comportamento de esquia observado em indivíduos TG

Quanto ao LCE, indivíduos transgênicos permaneceram menor tempo nos braços fechados do LCE quando comparados aos animais WT [ANOVA dois critérios;  $F_{(1,28)}$  interação = 0,527,  $p = 0,473$ ;  $F_{(1,28)}$  tratamento = 7,18,  $p = 0,012$ ;  $F_{(1,28)}$  genótipo = 11,87,  $p = 0,001$ ; Tukey pós-teste] (Figura 29A). Por outro lado, indivíduos TG tratados com FK506 apresentam tempo médio de permanência nos braços fechados similar aos indivíduos WT. Resultado similar foi percebido para a avaliação do tempo médio de permanência nos braços abertos [ANOVA dois critérios;  $F_{(1,28)}$  interação = 1,736,  $p = 0,198$ ;  $F_{(1,28)}$  tratamento = 4,409,  $p = 0,035$ ;  $F_{(1,28)}$  genótipo = 6,09,  $p = 0,02$ ; Tukey pós-teste] (Figura 29B).

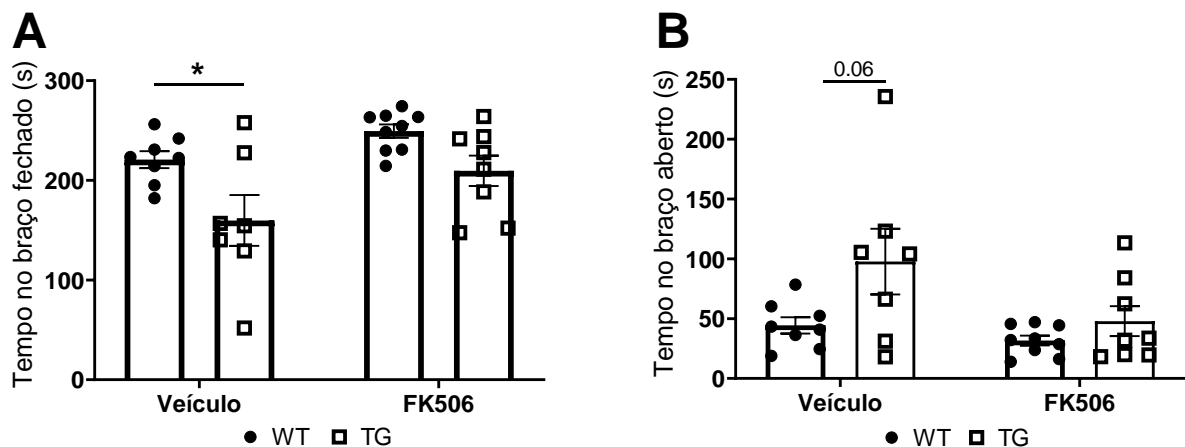


Figura 29: Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre o comportamento no LCE em indivíduos TG ou WT. Tempo de permanência nos braços fechados (A) e nos braços abertos (B) do LCE avaliado no dia 24 de tratamento. N (WT + Veí = 8, WT + FK506 = 8, TG + Veí = 9, TG + FK506 = 9). \*  $p < 0.05$ .

#### 4.20. O tratamento crônico com FK506 reverteu o comprometimento no comportamento de interação social, mas não na tarefa de reconhecimento de objetos ou na avaliação da memória social

Para avaliação cognitiva, utilizamos TRO e IMS. Notamos que indivíduos WT tratados com veículo foram capazes de reconhecer o objeto novo na TRO [Teste t para uma amostra,  $t_{(6)} = 3,379$ ,  $p = 0,014$ ]. No entanto, tanto indivíduos WT tratados com FK506 quanto indivíduos TG tratados com veículo ou tratados com FK506 não foram capazes de reconhecer o objeto novo (Figura 30A e Anexo K). Indivíduos WT tratados apenas com veículo também apresentaram maior tempo de exploração do compartimento do juvenil no IS [Teste t para uma amostra,  $t_{(7)} = 3,012$ ,  $p = 0,019$ ],

evidenciando maior percentual de interação social, o que não foi percebido em indivíduos TG tratados com veículos (Figura 30B e Anexo K). Por outro lado, tanto animais TG tratados com veículos quanto animais TG tratados com FK506 apresentaram percentual de interação social significativos [Teste t para uma amostra; para WT + FK  $t_{(7)} = 4,925$ ,  $p = 0,001$ ; para TG + FK  $t_{(7)} = 3,10$ ,  $p = 0,017$ ] (Figura 30B). Já na avaliação de MS, nenhum dos grupos experimentais apresentou percentual de memória social estatisticamente significativo (Figura 30C e Anexo L).

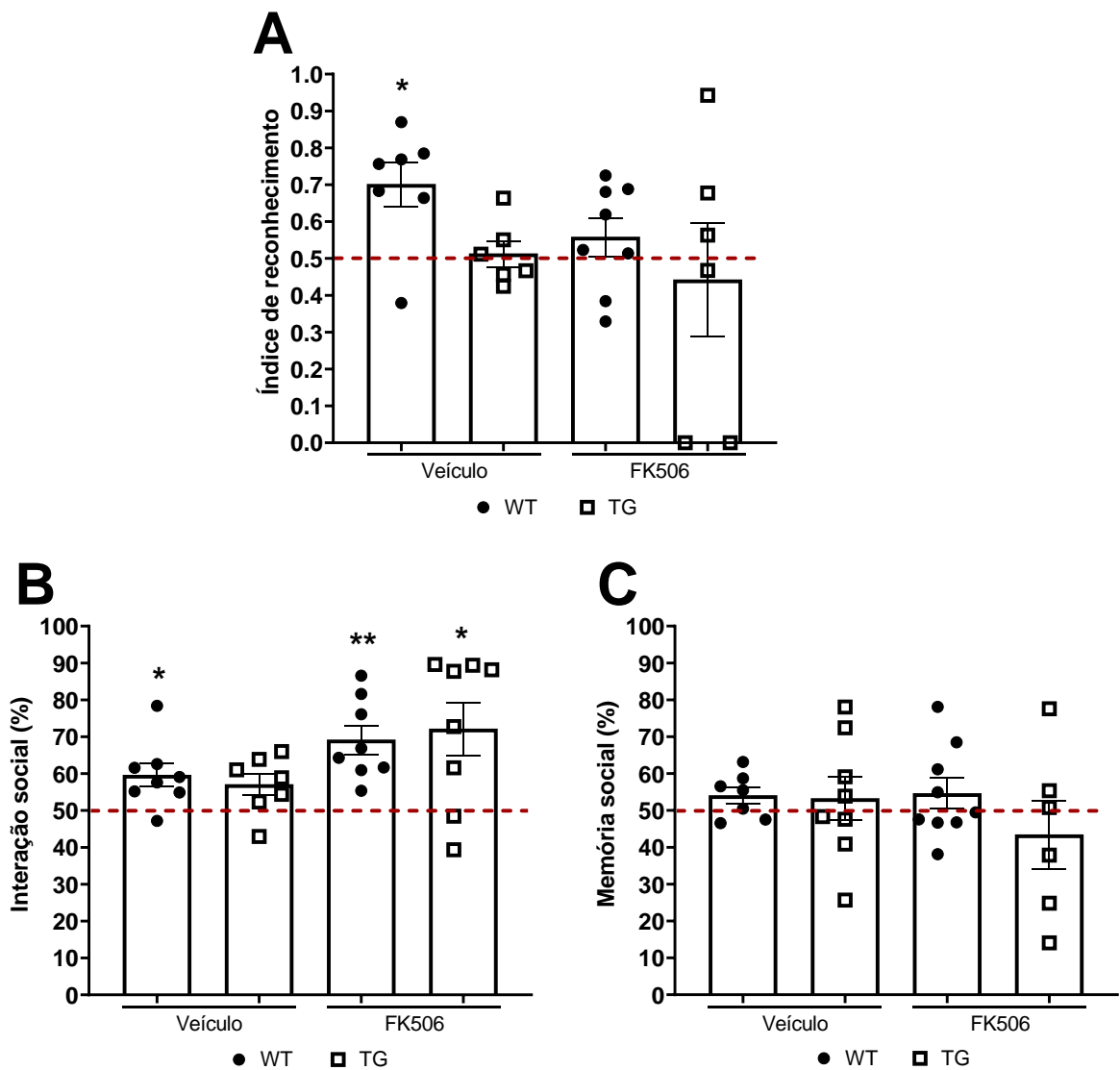


Figura 30: Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre a cognição em indivíduos TG ou WT. Tarefa de reconhecimento de objeto novo avaliada entre os dias 26 e 29 de tratamento (A), interação social avaliada no dia 30 de tratamento (B) e memória social avaliada no dia 30 de tratamento (C). N (WT + Vei = 8, WT + FK506 = 8, TG + Vei = 9, TG + FK506 = 9). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.21. O tratamento crônico com FK506 não alterou o conteúdo de placas A $\beta$ encontradas no hipocampo de indivíduos TG

Observamos acúmulo de placas do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> no hipocampo de indivíduos transgênicos APP/PS1 (Figura 31A e D). No entanto, o tratamento com FK506 por 30 dias não foi capaz de reduzir o acúmulo de A $\beta$ <sub>1-42</sub> observada no hipocampo de indivíduos TG [Teste t,  $t_{(3)} = 0,55$ ,  $p = 0.62$ ] (Figura 31A e E). É importante mencionar que não houve imunomarcagem para A $\beta$  em indivíduos WT tratados com veículo ou com FK506 (Figura 31B e C).

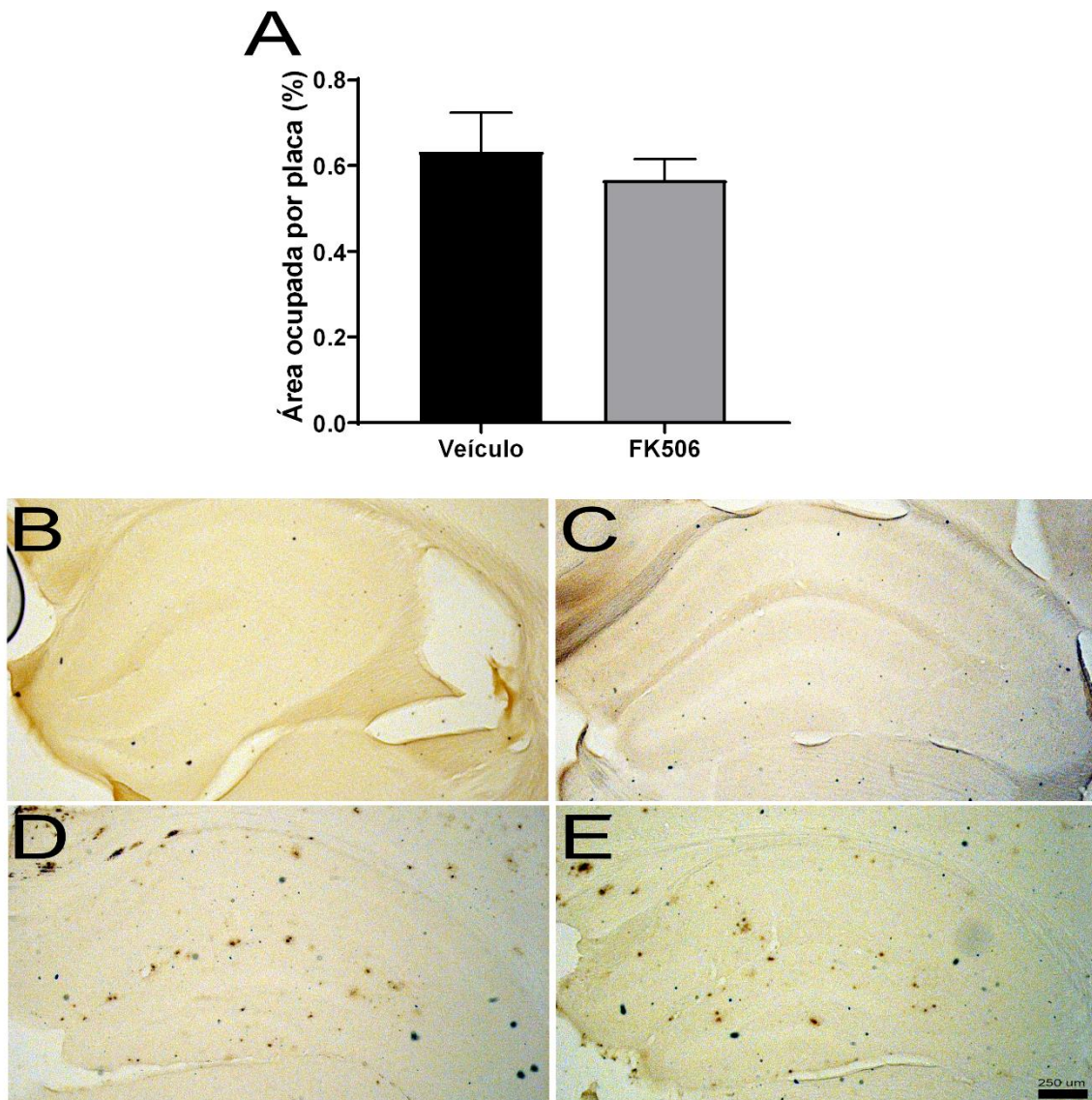


Figura 31: Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre o conteúdo de A $\beta$ <sub>1-42</sub> no hipocampo de indivíduos TG ou WT. A – Percentual da área ocupada pela imunomarcagem por A $\beta$ <sub>1-42</sub>. B – Fotomicrografia do hipocampo de animal WT tratado com veículo. C – Fotomicrografia do hipocampo de animal WT tratado com FK506. D – Fotomicrografia de animal TG tratado com veículo. E – Fotomicrografia de animal TG tratado com FK506. N (TG + Vei = 3, TG + FK506 = 3). Objetiva de 5x. Escala 250  $\mu$ m.

#### 4.22. A densidade de neurônios NeuN-positivos no hipocampo não foi alterada pelo genótipo ou pelo tratamento crônico com FK506

Não observamos alteração na densidade óptica da camada granular do giro denteado ou na camada piramidal de CA1 entre indivíduos TG e WT (Figura 32A – C e Anexo M). Também não houve qualquer efeito do tratamento crônico com FK506 sobre essa variável (Anexo M).

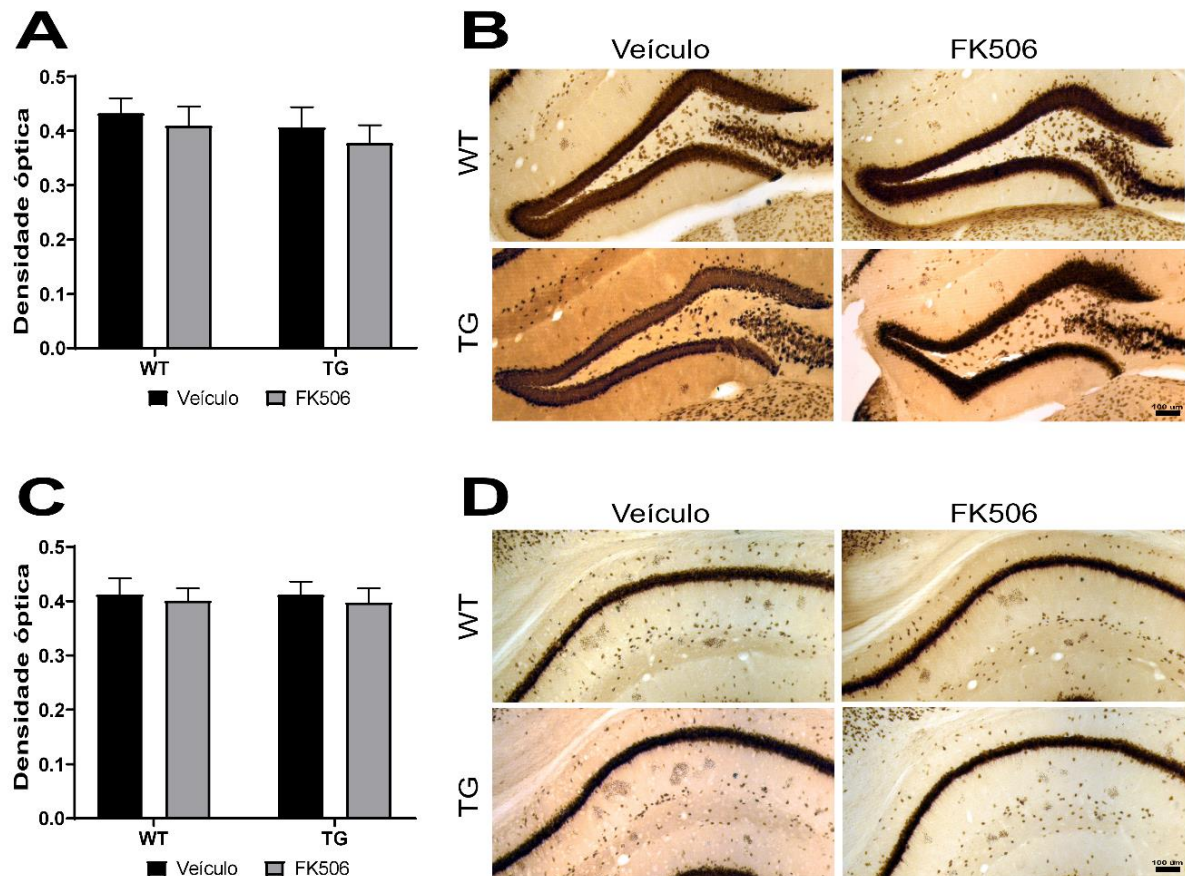


Figura 32: Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre a imunomarcção por NeuN no hipocampo de indivíduos TG ou WT. A – Densidade óptica da camada granular do GD do hipocampo. – Densidade óptica da camada piramidal de CA1 do hipocampo. D – Fotomicrografias representativas da imunomarcção por NeuN no GD e em CA1 do hipocampo. N (WT + Vei = 5, WT + FK506 = 5, TG + Vei = 5, TG + FK506 = 4). Objetiva de 10x. Escala 100  $\mu$ m.

#### 4.23. O tratamento crônico com FK506 reduziu a microgliose encontrada em CA1 do hipocampo de indivíduos TG, mas não a microgliose encontrada no GD

Observamos um aumento na densidade integrada da imunomarcção por Iba-1 no GD do hipocampo de animais TG, quando comparados aos animais WT, tanto tratados com veículo quanto tratados com FK506 [ANOVA dois critérios;  $F_{(1, 16)}$  interação = 0,0213,  $p = 0,885$ ;  $F_{(1, 16)}$  genótipo = 22,88,  $p = 0,0002$ ;  $F_{(1, 16)}$  = 0,621;  $P = 0,44$ ; pós-teste de Tukey], indicando um processo de microgliose no hipocampo de

animais TG (Figura 33A e B). No entanto, o tratamento crônico com FK506 não foi capaz de reverter a microgliose encontrada no GD do hipocampo de animais TG (Figura 33A e C). Por outro lado, o tratamento com FK506 reduziu a microgliose encontrada em CA1 do hipocampo de animais TG, uma vez que indivíduos TG tratados com o inibidor da calcineurina não diferem daqueles tratados apenas com veículo [ANOVA dois critérios;  $F_{(1, 13)}$  interação = 4,085,  $p = 0,064$ ;  $F_{(1, 13)}$  genótipo = 6.633,  $p = 0,023$ ;  $F_{(1, 13)}$  = tratamento 0.030,  $p = 0,86$ ; pós-teste de Tukey] (Figura 33C e D).

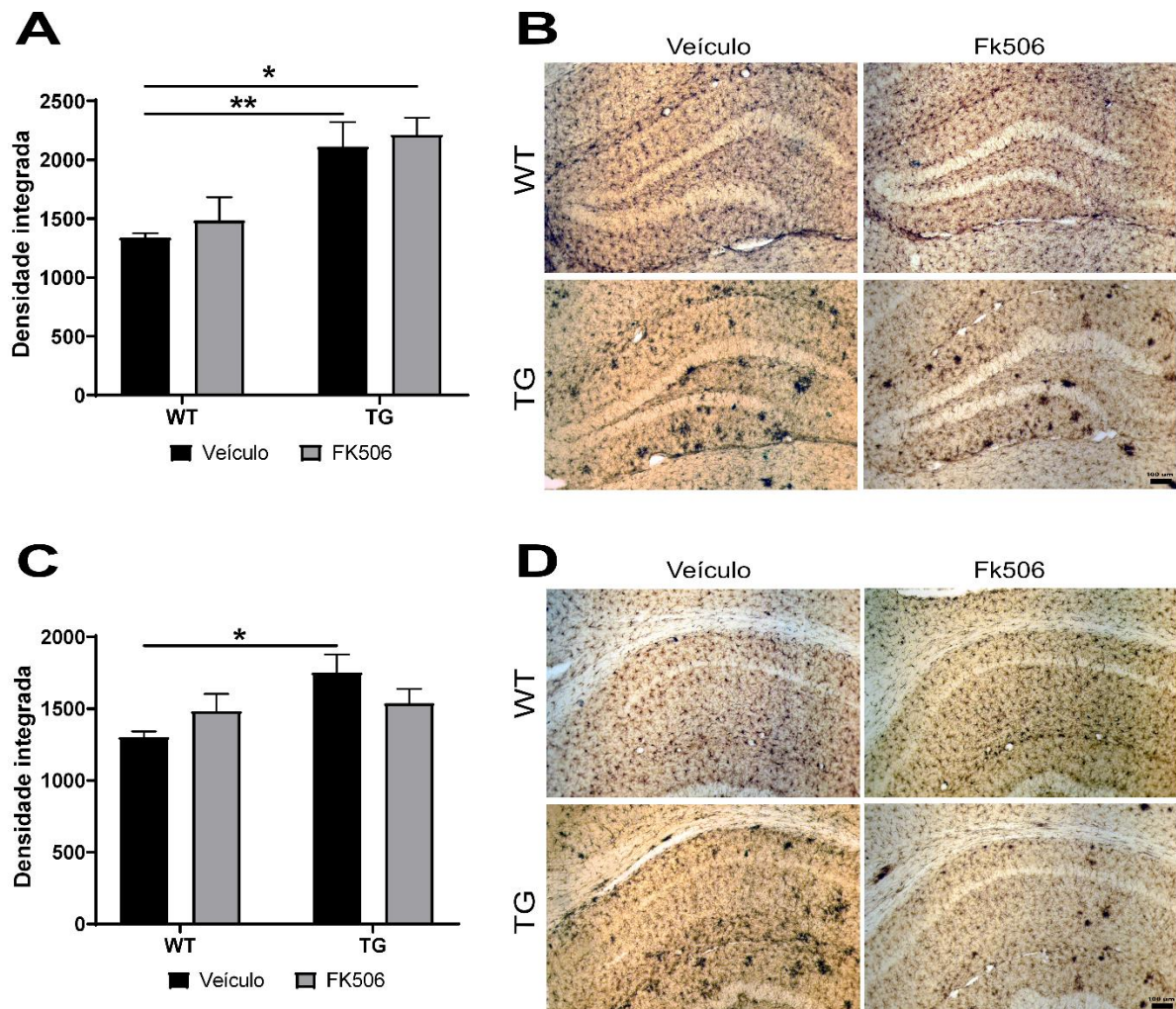


Figura 33: Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre a microgliose no GD do hipocampo de indivíduos TG ou WT. Densidade integrada (A) e fotomicrografias representativas (B) de CA1 do hipocampo de animais TG ou WT. Densidade integrada (C) e fotomicrografias representativas (D) do GD do hipocampo de animais TG ou WT. N (WT + Veí = 5, WT + FK506 = 5, TG + Veí = 5, TG + FK506 = 6). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . Objetiva de 10x. Escala 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.24. O tratamento crônico com FK506 não reverteu a redução nos níveis de BDNF no hipocampo de indivíduos TG

Para avaliar as possíveis alterações no perfil de liberação de fatores neurotróficos no hipocampo e no córtex pré-frontal de animais transgênicos APP/PS1

e o possível efeito do tratamento crônico com FK506 sobre esse perfil, dosamos as concentrações de BDNF, GDNF e NGF.

Houve uma redução nos níveis de BDNF no hipocampo de indivíduos TG, quando comparados aos WT [ANOVA dois critérios;  $F_{(1, 22)}$  interação = 4,117,  $p = 0,054$ ;  $F_{(1, 22)}$  Genótipo = 48,68,  $p < 0,0001$ ;  $F_{(1, 22)}$  tratamento = 9,790,  $p = 0,004$ ; pós-teste de Tukey] (Figura 34A). Além disso, indivíduos tratados com FK506 por 30 dias apresentaram uma redução ainda mais importante dos níveis de BDNF no hipocampo, diferindo de todos os demais grupos experimentais. Não houve qualquer efeito do genótipo do tratamento com FK506 sobre os níveis de GDNF e NGF no hipocampo (Figura 34B e C e Anexo N). Também não houve qualquer efeito do genótipo ou do tratamento com FK506 sobre os níveis de BDNF, GDNF e GNF no córtex pré-frontal (Figura 34D – F e Anexo N).

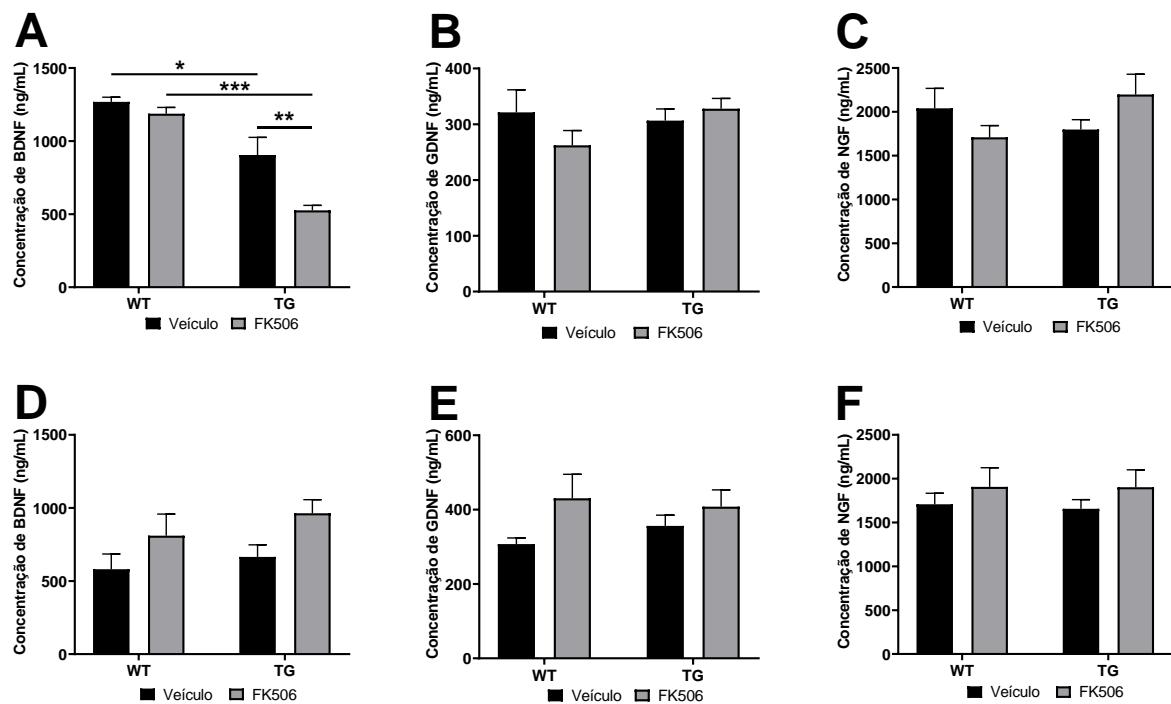


Figura 34: Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre as concentrações de fatores neurotróficos no hipocampo e no córtex pré-frontal de indivíduos TG ou WT. A – Concentração de BDNF no hipocampo. B – Concentração de GDNF no hipocampo. C – Concentração de NGF no hipocampo. D – Concentração de BDNF no córtex pré-frontal. E – Concentração de GDNF no córtex pré-frontal. F – Concentração de NGF no córtex pré-frontal. N (WT + Vei = 6, WT + FK506 = 8, TG + Vei = 7, TG + FK506 = 8). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.25. O perfil de liberação de citocinas no hipocampo e no córtex pré-frontal não foi alterado pelo genótipo ou pelo tratamento crônico com FK506

Para avaliar as possíveis alterações no perfil de liberação de citocinas no hipocampo e no córtex pré-frontal de animais transgênicos APP/PS1 e o possível efeito do tratamento crônico com FK506 sobre esse perfil, dosamos as concentrações das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e da quimiocina CX3CL1. No entanto, não percebemos qualquer alteração do perfil de liberação de citocinas ou da quimiocina CX3CL1 no hipocampo de indivíduos TG, quando comparados aos indivíduos WT, ou qualquer efeito do tratamento crônico com 5 mg/kg de FK506 (Figura 35A – E e Anexo O). De modo semelhantes, nenhum efeito do genótipo ou do tratamento com FK506 foi observado no córtex pré-frontal (Figura 35F – J e Anexo O).

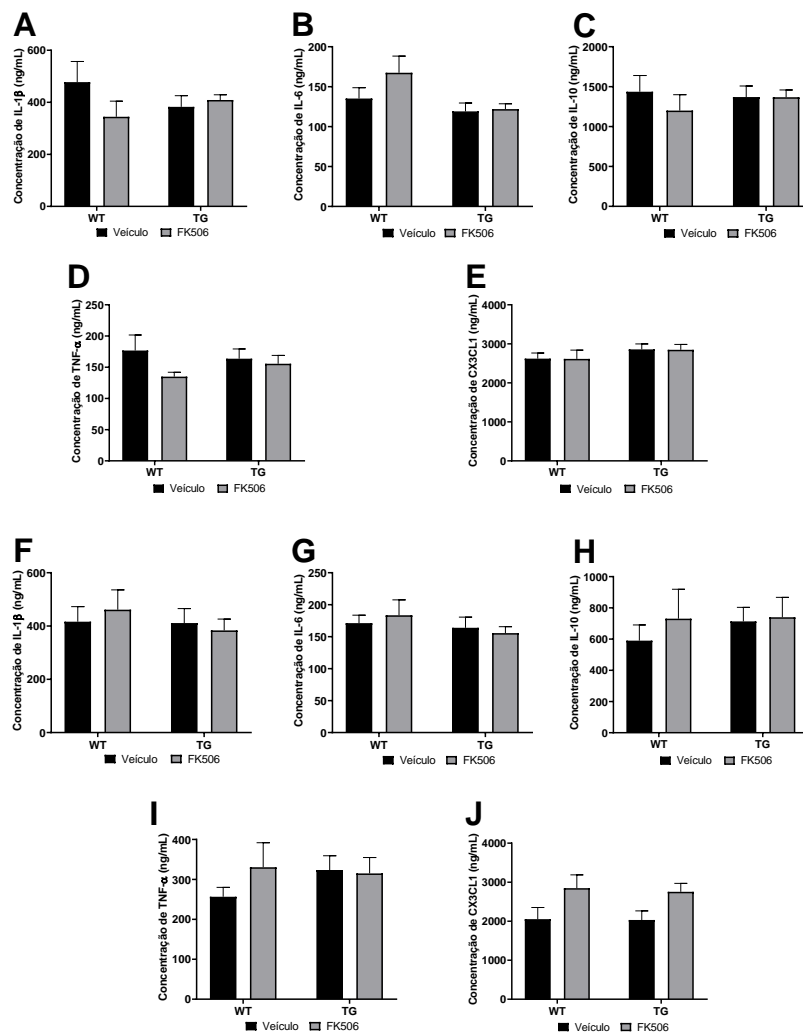


Figura 35: Efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre as concentrações de citocinas no hipocampo e no córtex pré-frontal de indivíduos TG ou WT. Concentração de IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), IL-10 (C), TNF- $\alpha$  (D) e CX3CL1 (E) no hipocampo. Concentração de IL-1 $\beta$  (F), IL-6(G), IL-10(H), TNF- $\alpha$  (I) e CX3CL1 (J) no córtex pré-frontal. N (WT + Vei = 6, WT + FK506 = 8, TG + Vei = 7, TG + FK506 = 8).



## 5. Discussão

No presente trabalho, nós investigamos os efeitos do ICN FK506 em três modelos experimentais para DA. Foi mostrado que o pré-tratamento com FK506 foi capaz de impedir o comprometimento cognitivo induzido pela microinjeção intrahipocampal de NMDA ou de A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Esse efeito foi acompanhado pela redução da neurodegeneração evidenciada por FJC e da microgliose hipocampal no modelo de microinjeção de A $\beta$ . Além disso, notamos que o FK506 foi capaz de impedir a redução da expressão de NeuN em culturas organotípicas de hipocampo de camundongos. Por fim, o tratamento crônico com FK506 reverteu o comprometimento do comportamento de esquiva e do comportamento social observado em animais transgênicos APP/PS1, além de reduzir a microgliose encontrada em CA1 do hipocampo de animais TG.

A utilização dos modelos de microinjeção de agente neurotóxico no presente trabalho teve como objetivo avaliar dois aspectos básicos que contribuem para a progressão da doença em graus diferentes e em diferentes etapas dessa condição patológica. Além disso, a utilização do animal duplo transgênico tem como objetivo a avaliação da utilização do inibidor da calcineurina em um modelo que representa de forma mais completa e complexa a doença humana, especialmente a forma familiar da DA.

### 5.1. Efeitos da inibição da calcineurina na neurotoxicidade induzida por NMDA

No presente trabalho, nós utilizamos o modelo de comprometimento cognitivo induzido pela microinjeção intrahipocampal de NMDA, que teve como objetivo simular a excitotoxicidade mediada por glutamato e por receptores do tipo NMDA sabidamente envolvida na fisiopatologia de DA (JAKARIA *et al.*, 2018; LEWERENZ; MAHER, 2015; WANG, YAN; QIN, 2010). Mesmo que tal evento não ocorra exclusivamente em DA (LEWERENZ; MAHER, 2015; PRENTICE; MODI; WU, 2015), tal investigação contribui de forma significativa para a melhor compreensão de aspectos fisiopatológicos básicos envolvidos nessa condição patológica e sua relação com o comprometimento cognitivo e com as alterações histológicas observadas na doença.

Inicialmente, nossos resultados mostraram que a microinjeção intrahipocampal de NMDA é capaz de induzir comprometimento na evocação da memória de reconhecimento do objeto novo na TRO, um paradigma amplamente utilizado para

avaliação cognitiva em camundongos (LUEPTOW, 2017). Além do mais, animais microinjetados com solução salina estéril foram capazes de reconhecer o objeto novo, demonstrando que a avaliação comportamental feita em nosso laboratório com animais C57BL/6 de 8-12 semanas de idade reproduziu o que era esperado para o paradigma. Essa observação também evidencia que a cirurgia por si só ou a microinjeção de solução inócua não foram responsáveis pela alteração comportamental, mas sim a microinjeção do agente neurotóxico.

De modo interessante, uma única injeção i.p. de 5 mg/kg de FK506 30 minutos antes da microinjeção de NMDA foi capaz de impedir o comprometimento na evocação da memória de reconhecimento do objeto novo percebida por nós em indivíduos tratados somente com veículo. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investigou o efeito da inibição da calcineurina no modelo de comprometimento cognitivo induzido por microinjeção de NMDA. Sabendo da importante participação de  $Ca^{2+}$  no processo excitotóxico, que culmina em degeneração neuronal e perda de função, e tendo em mente que a calcineurina é uma proteína dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina, que também é capaz de modular os níveis intracelulares desse íon (FITZGERALD; BURGOYNE; HAYNES, 2008; LI, LU; STEFAN; LE NOVÈRE, 2012), é possível que a inibição dessa fosfatase tenha efeitos distintos em diferentes fases da patologia. A observação feita por nós indica que a calcineurina pode estar atuando em eventos iniciais relacionados ao dano cognitivo percebido após um evento excitotóxico e a que inibição dessa proteína tem efeito protetor nesse modelo.

A microinjeção por NMDA induziu marcação por FJC, evidenciando um processo neurodegenerativo em curso, e perda neuronal severa, o que não foi impedido pelo FK506. No processo excitotóxico induzido pela desregulação de glutamato e superativação dos receptores do tipo NMDA, a morte é iniciada por um influxo exagerado de  $Ca^{2+}$ , acompanhado de disfunção mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, déficit de ATP e liberação de fatores apoptóticos (BERNARDI *et al.*, 2006; RAO, V K; CARLSON; YAN, 2014; VELASCO *et al.*, 2017). Dessa forma, sabendo que a calcineurina é uma proteína dependente de  $Ca^{2+}$ /CaM, além de também ser capaz de regular as concentrações intracelulares desse íon (FITZGERALD; BURGOYNE; HAYNES, 2008; LI, LU; STEFAN; LE NOVÈRE, 2012), é possível que a inibição da calcineurina tenha reduzido os efeitos intracelulares

produzidos pela superativação do receptor do tipo NMDA. Apesar de não termos avaliado os níveis de calcineurina no presente estudo, outros autores já demonstraram redução da atividade e dos níveis de CN no hipocampo de camundongos 6 e 36 horas após injeção de 5 ou 10 mg/kg de FK506 (DINELEY *et al.*, 2007; TAGLIALATELA *et al.*, 2010). Também é importante notar que a concentração de NMDA usada neste trabalho tem como objetivo induzir comprometimento cognitivo e perda neuronal (CUNHA XAVIER PINTO *et al.*, 2015) e, portanto, é possível o inibidor da calcineurina FK506 tenha efeitos ainda mais interessantes em eventos excitotóxico menos severos, como os que ocorrem durante a progressão de DA.

De modo complementar, nós percebemos aumento dos níveis de fosforilação de Akt em animais que receberam NMDA 24 horas após a microinjeção. Akt é uma proteína presente no citoplasma e que está sabidamente envolvida com a sobrevivência de neurônios (BRUNET, A.; DATTA; GREENBERG, 2001). Quando ativada por meio de fosforilação, Akt migra para o núcleo e atua na ativação de vias de sobrevivência que previnem apoptose (BRAZIL; HEMMINGS, 2001; DOWNWARD, 1998). Já foi observado que o pré-condicionamento de neurônios hipocampais com concentrações baixas de NMDA ou de glutamato atua de forma neuroprotetor por induzir a síntese de BDNF e induzir a ativação da via PI3-kinase-Akt, reduzindo a ativação de vias apoptóticas (ALMEIDA *et al.*, 2005; HANSEN, HENRIK H. *et al.*, 2004; JIANG, XUEYING *et al.*, 2005; LUO, HONGBO R. *et al.*, 2003; SORIANO *et al.*, 2006; SWIATKOWSKI *et al.*, 2017). Nesse sentido, o aumento da ativação de Akt no hipocampo de animais microinjetados com NMDA, evidenciada pelo aumento nos níveis de fosforilação dessa proteína, provavelmente é uma resposta do sistema na tentativa de evitar a morte neuronal. No entanto, os níveis de fosforilação no hipocampo de indivíduos tratados com FK506 80 minutos antes do estímulo com NMDA também estão alterados.

Além do mais, notamos uma tendência na redução dos níveis de fosforilação de Erk<sub>1/2</sub> – sabidamente envolvida na promoção da sobrevivência neuronal (CRUZ; CRUZ, 2007; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2010; SUN, JING; NAN, 2017) – 24 horas após a microinjeção, o que não foi percebido no grupo que recebeu FK506. Tal achado pode ter relação com alterações na expressão ou na ativação de diferentes tipos de receptores NMDA, uma vez que já é sabido que os receptores do NR2B estão mais amplamente associados à ativação dessa quinase (DEEP *et al.*, 2019; KRPIVINSKY

*et al.*, 2003; SAVA *et al.*, 2012). Sendo assim, experimentos adicionais para avaliação da expressão e ativação de tais receptores, além da via de ativação das caspases e de outras proteínas envolvidas em vias de sobrevivência e morte celular serão necessários para avaliar se o FK506 atua promovendo efeito anti-apoptótico no modelo proposto.

O estímulo por NMDA não aumentou o número de micróglia. No entanto, da mesma forma que o estímulo com NMDA induziu morte neuronal, é razoável pensar que também tenha induzido morte de micróglia. Também observamos que o FK506 por si só induziu aumento do número de células iba-1-positivas. Nesse sentido, sabemos que a resposta microglial atua protegendo contra o dano excitotóxico (SZALAY *et al.*, 2016; TURRIN; RIVEST, 2006; VINET *et al.*, 2012) e a depleção dessa célula leva alterações no controle de  $Ca^{2+}$  e a morte neuronal induzida por insulto isquêmico (SZALAY *et al.*, 2016). Nesse sentido, é possível que a indução de uma resposta microglial prévia ao estímulo neurotóxico tenha atuado de forma protetora nos modelos utilizados por nós e isso pode estar relacionado a ausência de comprometimento cognitivo em animais tratados com 5 mg/kg de FK506.

Somado aos achados do modelo *in vivo*, no modelo *ex vivo* de cultura organotípicas de fatias de hipocampo, percebemos que o estímulo com NMDA induziu uma redução na expressão de NeuN, sugerindo perda neuronal. Essa redução foi impedida tanto pelo tratamento com FK506, mostrando que o FK506 pode ser capaz de reduzir o processo de neurodegeneração após estímulo com concentrações menos de NMDA. Além disso, a redução da expressão de NeuN também foi impedida pela depleção da micróglia, evidenciando mais uma vez o papel importante dessa célula no processo excitotóxico mimetizado pelo modelo de microinjeção de NMDA.

## **5.2. Efeitos da inibição da calcineurina após estímulo com $A\beta_{1-42}$**

Uma das hipóteses mais aceitas para DA, é a hipótese amiloide.  $A\beta$  tem efeito neurotóxico por si só ou ainda pode ativar a resposta imune e uma cascata inflamatória que também pode contribuir para morte neuronal, e todos esses fatores contribuem para a perda de função, como o comprometimento da memória (LACOR *et al.*, 2007; MENG *et al.*, 2019; NABESHIMA; NITTA, 1994; SELKOE; HARDY, 2016). Sabemos, ainda, que o peptídeo  $A\beta$  é capaz de alterar o processo de liberação e/ou de recaptação de glutamato, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ARIAS; ARRIETA; TAPIA, 1995;

FERNÁNDEZ-TOMÉ *et al.*, 2004; PARPURA-GILL; BEITZ; UEMURA, 1997), e ainda pode induzir alterações nos receptores NMDA (NMDAR) (RÖNICKE *et al.*, 2011).

A microinjeção de A $\beta$ <sub>1-42</sub> simula a produção exagerada desse peptídeo em pacientes com DA. A $\beta$  tem efeito neurotóxico por si só, induzindo morte neuronal e perda de função, como o comprometimento da memória (LACOR *et al.*, 2007; MENG *et al.*, 2019; NABESHIMA; NITTA, 1994; SELKOE; HARDY, 2016). Em nosso trabalho, mostramos que a microinjeção intrahipocampal de A $\beta$  induziu comprometimento cognitivo 24 horas após a microinjeção. Outros trabalhos já tinham avaliado o impacto de A $\beta$  7 dias (ou mais/menos) após a microinjeção hipocampal, incluindo trabalhos realizados em nosso laboratório (BELLOZI *et al.*, 2016; BELLOZI; GOMES; DA SILVA; *et al.*, 2019). O que difere o presente trabalho dos demais é que aqui nós testamos o impacto da neurotoxicidade induzida por A $\beta$  sobre a última fase avaliado pela TRO, a fase de evocação da memória. Sendo assim, incluímos na literatura um dado importante que serve de subsídio para outros estudos que queiram avaliar os estágios mais iniciais do processo neurotóxico induzido por esse peptídeo.

Nossos dados também mostram que a inibição da calcineurina pelo pré-tratamento com a dose de 5 mg/kg de FK506 impediu o dano cognitivo induzido pelo A $\beta$ . Outros autores já mostraram o efeito da utilização de CNI em modelos de DA. Sabe-se que CN está superexpressa tanto em modelos de injeção de peptídeo quanto em modelos genéticos para DA (DINELEY *et al.*, 2007, 2010) e que a inibição dessa proteína é capaz tanto de impedir quanto de reverter o déficit cognitivo encontrado nesses modelos (CAVALLUCCI; BERRETTA, 2013; DINELEY *et al.*, 2007, 2010; TAGLIALATELA *et al.*, 2010) e reduzir o acúmulo de A $\beta$  (HONG *et al.*, 2010; ROZKALNE; HYMAN; SPIRES-JONES, 2011), sugerindo um potencial neuroprotetor gerado pelos ICN.

Apesar de não termos notado perda neuronal em indivíduos microinjetados com A $\beta$ , percebemos a presença de coloração por FJC, indicando que os neurônios podem estar em processo de neurodegeneração, mas que ou o dano não é severo ao ponto de induzir perda significativa ou que o processo ainda está em fase inicial. De modo interessante, a marcação por FJC foi revertida pelo pré-tratamento com 5 mg/kg de FK506. Sabemos que morte neuronal induzida por espécies amiloide pode ser mediada por mecanismos diversos (LEONG *et al.*, 2020; TELEGINA *et al.*, 2019) e é provável que o A $\beta$  esteja induzindo um processo de degeneração mais lento no

modelo usado no presente trabalho. Tal hipótese também é corroborada pelo fato não termos notado alterações nos níveis de fosforilação de Akt e Erk, proteínas sabidamente envolvidas em vias de sobrevivência neuronal (BRAZIL; HEMMING, 2001; CRUZ; CRUZ, 2007; DOWNWARD, 1998; SUN, JING; NAN, 2017).

Além disso, o método de ativação de A $\beta$  utilizado em nosso trabalho induz a produção de agregados diméricos, oligoméricos e na forma de placas, porém é sabido que as espécies oligoméricas são mais neurotóxicas do que as formas fibrilares (JAN *et al.*, 2011). A perda neuronal induzida pela microinjeção de agregados já foi observada 7 dias após o estímulo (BELLOZI; GOMES; DA SILVA; *et al.*, 2019). É provável que no tempo de 24 horas após a microinjeção o processo de morte neuronal ainda não tenha começado ou esteja em fase inicial. Apesar do efeito neuroprotetor da inibição da calcineurina no modelo de microinjeção de A $\beta$  percebido por nós e por outros autores, o que ainda não está claro é quais mecanismos estão mais estritamente associados à essa proteção.

A calcineurina pode ativar o fator de transcrição NFAT e que tal via tem relação com a ativação da resposta imune (BENDICKOVA; TIDU; FRIC, 2017; HOGAN *et al.*, 2003). Foi demonstrado que ICN, por meio do FK506 ou do peptídeo tat-VIVIT, é capaz de atenuar a ativação microglial em animais transgênicos para DA (ROJANATHAMMANEE *et al.*, 2015). Dessa forma, nós testamos o possível efeito do pré-tratamento com ICN sobre a microgliose induzida pela microinjeção de A $\beta$ . Percebemos que o tratamento com 5 ou 10 mg/kg de FK506 impediu a microgliose no GD do hipocampo induzida pela microinjeção de A $\beta$ .

Sabemos que as micróglia estão ativadas desde as fases iniciais de DA e que isso contribui para a progressão da doença (GIOVANNINI *et al.*, 2002; HANSEN, DAVID V.; HANSON; SHENG, 2018; HICKMAN; ALLISON; EL KHOURY, 2008b; PHILLIPS, EMMA C. *et al.*, 2014). Sendo assim, também é provável que a injeção de FK506 previamente ao estímulo com A $\beta$  tenha induzido ativação da micróglia antes mesmo do insulto. Essa hipótese é potencializada pelo fato de o tratamento com FK506 ter induzido aumento do número de micróglia no giro denteado do hipocampo mesmo na ausência de estímulo neurotóxico. Em conjunto, esses eventos podem explicar parte do efeito protetor do FK506 observado em nosso modelo experimental.

Micróglias são células de grande atividade (HANISCH; KETTENMANN, 2007; KETTENMANN, H. *et al.*, 2011; RAIVICH, 2005) e que desempenham uma série de funções no sistema nervoso homeostático, monitorando os elementos sinápticos e o parênquima cerebral (KETTENMANN, HELMUT; KIRCHHOFF; VERKHRATSKY, 2012; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005; TREMBLAY, 2011; TREMBLAY *et al.*, 2011; TREMBLAY; LOWERY; MAJEWSKA, 2010). Além do mais, vários trabalhos têm mostrado o papel da micróglia na plasticidade sináptica e tem papel fundamental no processo de aprendizagem e memória (CLARK, ANNA K. *et al.*, 2015; PARKHURST *et al.*, 2013; ROGERS *et al.*, 2011; ZHAN *et al.*, 2014; ZHOU, LI-JUN *et al.*, 2019), o que também contribui para a hipótese do papel protetor do aumento da atividade da micróglia em nosso modelo.

Também é razoável pensar que estímulos variados levam a respostas diferentes, como já citado anteriormente nessa discussão. Isso significa que, mesmo observando ativação microglial em diferentes situações, não necessariamente encontramos o mesmo tipo de perfil de resposta, seja essa resposta molecular, bioquímica ou morfológica (GERTIG; HANISCH, 2014). Dessa forma, entende-se que a micróglia não é uma entidade homogênea e diferentes subpopulações podem se distinguir em suas capacidades funcionais (ABELLANAS *et al.*, 2019; FITZNER *et al.*, 2011; KARPERIEN; AHAMMER; JELINEK, 2013; PANNELL *et al.*, 2014; SCHEFFEL *et al.*, 2012). Também é do nosso conhecimento que CN tem papel importante na regulação do fenótipo microglial (NAGAMOTO-COMBS; COMBS, 2010) e, dessa forma, é possível que também regule as alterações morfológicas desse tipo celular. Porém, também é possível que as células ameboides observadas sejam macrófagos que migraram de outras regiões encefálicas ou da periferia. A técnica utilizada por nós, no entanto, não permite diferenciar micróglias de outros macrófagos e, portanto, não podemos afirmar se houve ou não migração de células periféricas para a área do evento excitotóxico.

### **5.3. Efeitos do tratamento crônico com FK506 em animais APP/PS1**

Nós também avaliamos os efeitos do tratamento crônico com FK506 em animais transgênicos APP/PS1, um modelo mais complexo para DA (CARRERA *et al.*, 2014; LI, HAO; WEI, 2015) e no qual é possível observar de modo mais abrangente os efeitos de possíveis agentes terapêuticos sobre a fisiopatologia dessa doença

neurodegenerativa. É importante mencionar que tal modelo representa mais estreitamente a amiloidose e deposição exagerada e precoce observada na forma familiar da DA (BRYAN *et al.*, 2009; NEFF, 2019). Além disso, os modelos transgênicos são mais amplamente utilizados para avaliação de tratamentos crônicos e dos possíveis efeitos colaterais associados a eles.

Para evitar possíveis implicações da perda de peso ou comprometimento da capacidade locomotora na avaliação comportamental, nós pesamos os animais ao longo do tratamento e os submetemos à atividade exploratória do campo aberto previamente aos demais testes. Nesse sentido, o tratamento ou o genótipo não tiveram efeito sobre a massa ou sobre a atividade locomotora dos animais.

Curiosamente, indivíduos transgênicos exploraram por menor tempo o braço fechado do LCE, um teste comportamento frequentemente utilizado para avaliar comportamento do tipo ansioso em camundongos (WALF, ALICIA A; FRYE, 2007). Outros trabalhos já mostraram alterações na atividade de animais transgênicos no LCE. No entanto, esses estudos têm mostrado um comportamento do tipo ansiogênico em animais transgênicos para DA, o que é evidenciado por um maior tempo e exploração dos braços aberto do LCE (ou maior tempo de exploração dos braços fechados) (GALEANO *et al.*, 2014; PENTKOWSKI *et al.*, 2018; WEBSTER; BACHSTETTER; VAN ELDIK, 2013; ZHANG *et al.*, 2016). Dessa forma, é provável que as observações que fizemos nesse paradigma experimental sejam menos relacionados ao possível comportamento do tipo ansioso e mais à capacidade desses animais em reconhecer a situação de perigo representada pelos braços abertos, que pode estar afetada no modelo transgênico. A capacidade de reconhecer um ambiente ou situação aversivos e evitá-los é conhecida como comportamento de esquiva (KRYPTOS, 2015; LEDOUX *et al.*, 2017) e alguns trabalhos têm utilizado protocolos modificados de LCE para avaliar esse tipo de tarefa em roedores (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; DAHER; MATTIOLI, 2015; HLIŇÁK; KREJČÍ, 1998; MUTLU *et al.*, 2015).

A resposta defensiva dos animais está altamente relacionada a sua capacidade de reconhecer um ambiente aversivo, atividade que é dependente da integridade da atividade de regiões como hipocampo, amígdala, estriado e córtex pré-frontal (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2016; COLETTIS *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-SALINAS *et al.*, 2018; IZQUIERDO *et al.*, 1997;



JEZEK; WESIERSKA; FENTON, 2002). Como umas das regiões de maior deposição de A $\beta$  nos animais APP/PS1 são hipocampo e córtex pré-frontal, é possível que nossos dados evidenciem o comprometimento da capacidade inata de reconhecer o ambiente aversivo nesse modelo. Somado a isso, o tratamento crônico com FK506 foi capaz de reverter o comportamento dos animais TG observado no LCE, mostrando um efeito positivo do tratamento sobre atividades dependentes da memória emocional. Testes futuros utilizando paradigmas mais bem estabelecidos para a avaliação da memória emocional, como o teste de esQUIVA inibitória (ATUCHA; ROOZENDAAL, 2015), poderiam ajudar a esclarecer o possível efeito do tratamento com inibidor da calcineurina sobre esse tipo de comportamento.

Alterações no comportamento social também são observadas em pacientes com comprometimento moderado ou com DA (BEDIOU *et al.*, 2009; KIM, CUNYOEN *et al.*, 2016; SOMMERLAD *et al.*, 2019; WEISS *et al.*, 2008). Alterações na interação e memória social também estão presentes em modelos experimentais da doença (BELLOZI; GOMES; DA SILVA; *et al.*, 2019; BELLOZI; GOMES; DE OLIVEIRA; *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2016). Em nosso trabalho, nós percebemos que indivíduos TG apresentaram comprometimento da interação social. Tal comprometimento não foi percebido em indivíduos WT tratados de forma crônica com FK506 e, mais do que isso, o tratamento reverteu a alteração comportamental em indivíduos TG tratados com o inibidor da calcineurina.

O comportamento social está altamente associado à consolidação das relações interpessoais e com a manutenção da saúde mental (ADOLPHS, 2009; BZDOK; DUNBAR, 2020; HENRY *et al.*, 2016). Alterações nesse tipo de comportamento podem levar ao comprometimento da saúde mental, solidão, além de alterações na capacidade de reconhecer emoções ou de demonstrar empatia (BRÜNE *et al.*, 2007; BZDOK; DUNBAR, 2020; CACIOPPO; CAPITANIO; CACIOPPO, 2014; DODICH *et al.*, 2016; PHILLIPS, LOUISE H. *et al.*, 2010; RONAY; VON HIPPEL, 2015). Além do mais, o isolamento social está sabidamente relacionado a alterações comportamentais que elevam o risco de morbidade e mortalidade (BZDOK; DUNBAR, 2020; CACIOPPO; CAPITANIO; CACIOPPO, 2014). Dessa forma, terapias farmacológicas capazes de reverter o comprometimento no comportamento social podem ter impacto significativamente positivo sobre a qualidade de vida de pacientes com DA.

Por outro lado, indivíduos de 13 meses, TG ou WT, tratados ou não com FK506, não foram capazes de reconhecer o juvenil novo. É possível que o resultado obtido aqui tenha relação com a idade dos animais utilizados, uma vez que são indivíduos velhos e o comprometimento de memória pode ser observado em animais dessa idade mesmo na ausência de qualquer condição patológica (GOWER; LAMBERTY, 1993; KACZOROWSKI; DISTERHOFT, 2009; KOH; SPIEGEL; GALLAGHER, 2014; YANG; ZHOU; MA, 2019).

Também avaliamos a integridade de memória declarativa episódica por meio da TRO. A integridade da memória declarativa é altamente dependente da atividade do hipocampo (BIRD, 2017) e esse tipo de memória está sabidamente comprometida em paciente com DA (NESTOR; FRYER; HODGES, 2006; PETER *et al.*, 2014). Nossos dados mostraram que indivíduos WT foram capazes de reconhecer o objeto novo, o que não foi percebido em animais TG. No entanto, o tratamento com FK506 não reverteu o comprometimento observado nessa tarefa. Mais do que isso, indivíduos WT tratados com FK506 também não foram capazes de reconhecer o objeto novo, mostrando que o uso crônico da droga induziu comprometimento desse tipo de memória. A participação da calcineurina na plasticidade sináptica e neuronal (ARENDRT *et al.*, 2015; EICH *et al.*, 2017; KIM, SEONIL; ZIFF, 2014; MULKEY *et al.*, 1994), além de sua participação na aquisição, processamento e evocação da memória é conhecida (BAUMGÄRTEL; MANSUY, 2012).

Pessoas tratados com ICN para evitar rejeição de órgão após transplante podem ter memória comprometida (DE LA FUENTE *et al.*, 2014; LIN, CHIH HUNG *et al.*, 2003; MALLERET *et al.*, 2001; SACHSER *et al.*, 2016). Nesse sentido, é razoável pensar que pode haver comprometimento de memória em animais tratados por longo tempo com FK506. No entanto, sabendo do efeito benéfico que o tratamento com FK506 pode gerar, é possível avaliar outras doses, outros tempos, ou ainda a personalização do tratamento entre os indivíduos. A estratégia de personalização no tratamento tem sido usada em pacientes transplantados, uma vez que a farmacocinética desses ICN é alterada nesses indivíduos (BRUNET, MERCÈ *et al.*, 2019; WALLEMACQ *et al.*, 2009). A escolha da dose inicial, número de administrações diárias e a modificação da dose ao longo do tratamento, são feitas de modo diferente, o que tem reduzido os efeitos colaterais em pacientes tratados com FK506 para outras condições (ANDREWS *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2018; TURUNC *et al.*, 2019).

Apesar do comprometimento cognitivo observado em animais transgênicos não ter sido acompanhado por perda neuronal, nós observamos deposição de A $\beta$ <sub>1-42</sub> e significativa microgliose no hipocampo de animais APP/PS1. No entanto, o tratamento crônico não foi capaz de reverter tais achados. É fato que a deposição de amiloide-beta é um dos principais marcadores histopatológicos da doença e que esse peptídeo está associado ao déficit cognitivo encontrado em paciente ou em modelos para DA (LIN, WEI *et al.*, 2013; O' NEILL, 2013). Sabemos que a deposição de A $\beta$  nesses animais começa a partir já a partir do 6º mês de idade (JANKOWSKY *et al.*, 2004; LI, HAO; WEI, 2015; LOK *et al.*, 2013), de modo que a deposição de placas aos 12-13 meses é mais dificilmente reversível. Além do mais, a redução da deposição de placas amiloide não parece explicar sozinho possíveis efeitos benéficos sobre o comprometimento cognitivo, uma vez que intervenções que foram capazes de reduzir significativamente os níveis do peptídeo no cérebro de pacientes com DA falharam em reduzir ou reverter o comprometimento cognitivo (DOODY *et al.*, 2014; SEVIGNY *et al.*, 2016; SIEMERS *et al.*, 2016).

No presente trabalho, não percebemos alteração da densidade de células NeuN-positivas animais TG, o que sugere que não houve perda neuronal nesses animais, mesmo aos 12-13 meses de idade. É provável que aos 12 meses de idade ainda não seja possível perceber perda neuronal nos animais APP/PS1. Além disso, métodos mais complexos precisam ser utilizados para a avaliação precisa da estimativa de células NeuN-positivas no hipocampo desses animais. Apesar de a perda neuronal já ter sido mostrada em diversos modelos transgênicos para DA (BELLOZI; GOMES; DA SILVA; *et al.*, 2019; CALVO-RODRIGUEZ *et al.*, 2020; CASAS *et al.*, 2004; EIMER; VASSAR, 2013; LI, LUMING *et al.*, 2011), muitos trabalhos têm mostrado que disfunção sináptica é mais evidente e está mais relacionada ao comprometimento cognitivo do que a perda neuronal (DA SILVA *et al.*, 2016; KASHYAP *et al.*, 2019; SCHEFF *et al.*, 2006; SELKOE, 2002). Nesse sentido, a avaliação dos níveis de proteínas sinápticas, como sinaptofisina ou PSD-95, se faz necessária para avaliar o possível efeito benéfico do tratamento crônico com FK506. Além disso, análises adicionais da densidade de neurônio, micróglia e placas A $\beta$  no hipocampo e em outras regiões devem ser feitas com técnicas mais sensíveis e que consideram a característica tridimensional do tecido, como as técnicas baseadas em estereologia.

Sabendo que o hipocampo e o córtex pré-frontal são áreas nas quais há grande deposição de A $\beta$  no modelo APP/PS1 e conhecendo o papel dessas regiões em processos envolvidos na cognição e no comportamento social, decidimos avaliar se as alterações comportamentais observadas estariam associadas a modificações no perfil de liberação de fatores neurotróficos e de citocinas nessas duas áreas cerebrais. O fator neurotrófico BDNF, por exemplo, tem papel fundamental no destino dos neurônios durante o desenvolvimento, na sobrevivência neuronal e na plasticidade sináptica (MIRANDA *et al.*, 2019). Alterações nos níveis de BDNF no sangue de pacientes com DA já foram relatados (JUNG *et al.*, 2009; PLÁTENÍK *et al.*, 2014; YASUTAKE *et al.*, 2006). A redução nos níveis dessa neurotrofina também já foi observada em modelos experimentais e isso está associado ao comprometimento cognitivo (FANG *et al.*, 2019; FENG *et al.*, 2019; JIAO *et al.*, 2016; KOPEC *et al.*, 2020). Nós percebemos uma redução nos níveis de BDNF no hipocampo de animais transgênicos APP/PS1, no entanto o tratamento com FK506 não foi capaz de reverter tais níveis. No entanto, é possível que o tempo de tratamento ou dose utilizada não sejam os mais adequados e alterações no protocolo de administração, incluindo maior tempo de administração, podem contribuir para investigar os efeitos do FK506 sobre os níveis de BDNF e outros fatores neurotróficos. Além da avaliação desses fatores em outras regiões cerebrais.

Tendo em mente que o papel da resposta imune e inflamatória na DA guiaram o presente estudo, nós testamos os efeitos do FK506 sobre a microgliose presente no hipocampo de animais transgênicos e avaliamos os níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias no hipocampo e no córtex pré-frontal de animais WT ou TG, tratados ou não. Além disso, o acúmulo de A $\beta$  tem sido associado ao aumento da resposta inflamatória, especialmente mediada pela micróglia (BABCOCK *et al.*, 2015; BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; HENEKA *et al.*, 2015; HICKMAN; ALLISON; EL KHOURY, 2008a). Apesar de termos mostrado a presença de microgliose no hipocampo de animais transgênicos e de outros trabalhos já terem observado alterações no perfil de liberação de citocinas em animais APP/PS1 de diferentes idades (BABCOCK *et al.*, 2015; BELLOZI; GOMES; DA SILVA; *et al.*, 2019; KIYOTA *et al.*, 2010; LIN, XIAOYANG *et al.*, 2014; PATEL, NIKUNJ S. *et al.*, 2005), no presente trabalho nós não percebemos qualquer alteração induzida por genótipo ou pelo tratamento com FK506. É possível que a utilização de regiões inteiras e não de sub-regiões ou

laminações tenham diluído possíveis alterações encontradas em regiões mais específicas. Portanto, avaliações futuras mais refinadas deverão responder mais adequadamente os efeitos do tratamento crônico com FK506 sobre o perfil de citocinas no modelo proposto.

É preciso salientar que nenhum modelo experimental é capaz de representar sozinho toda a complexidade observada nessa doença multifatorial e que a utilização de mais de um modelo é fundamental para tentar avaliar diferentes processos encontrados em DA. Em nosso trabalho nós avaliamos os efeitos do inibidor da calcineurina FK506 em dois modelos de estímulo neurotóxico que mimetizam eventos que ocorrem durante a doença de Alzheimer e em um modelo transgênico – esse último associado ao tratamento crônico com FK506. Nos 3 modelos utilizados, percebemos comprometimento cognitivo e comportamental induzidos pelos eventos avaliados e um efeito positivo do FK506 sobre tais comprometimentos. A avaliação de eventos neurotóxicos mais pontuais, como a excitotoxicidade mediada por NMDA ou a neurotoxicidade induzida por  $A\beta_{1-42}$  auxiliam na melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos mais básicos envolvidos na doença e na busca de potenciais alvos terapêuticos. Já os modelos transgênicos – que mimetizam de modo mais complexo os achados comportamentais e histopatológicos de DA –, além de fornecerem base para a compreensão da fisiopatologia de doença, permitem avaliar potenciais terapias para essa condição, como o tratamento crônico com drogas ou anticorpos. Apesar do potencial efeito protetor evidenciado por este e outros estudos, análises adicionais e que utilizem outros modelos experimentais ainda precisam ser feitas para avaliar a possível utilização dos inibidores da calcineurina como terapia para DA.

## 6. Conclusão

Os resultados aqui apresentados demonstram o importante efeito protetor do inibidor da calcineurina FK506 em modelos que mimetizam eventos associados a DA. O FK506 é capaz de evitar o comprometimento cognitivo induzido por NMDA ou por  $A\beta_{1-42}$ , o que é acompanhado da redução da marcação por FJC e da microgliose no hipocampo em animais que receberam  $A\beta$ . O FK506 também protege culturas organotípicas de fatias de hipocampo contra a redução da expressão de NeuN induzida por NMDA. Por fim, o tratamento crônico de animais transgênicos para DA com FK506 é capaz de reverter alterações comportamentais observadas no LCE e no comportamento social, associado à redução da microgliose em CA1 do hipocampo, apesar de ainda ser necessário o melhor esclarecimento acerca das bases celulares e moleculares desses achados. Dessa forma, essa molécula é colocada em evidência como potencial alvo para o melhor entendimento de processos neurodegenerativos, de modo especial em doença de Alzheimer, além de fornecer bases para um potencial uso terapêutico dos inibidores de calcineurina nessa doença.

## 7. Bibliografia

ABDUL, Hafiz Mohammad *et al.* Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 29, n. 41, p. 12957–69, 14 out. 2009a. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2782445&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

ABDUL, Hafiz Mohammad *et al.* Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 41, p. 12957–12969, 14 out. 2009b.

ABELLANAS, Miguel Angel *et al.* Midbrain microglia mediate a specific immunosuppressive response under inflammatory conditions. *Journal of Neuroinflammation*, v. 16, n. 1, p. 233, 22 nov. 2019. Disponível em:

<<https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-019-1628-8>>. Acesso em: 14 jun. 2020.

ADOLPHS, Ralph. The Social Brain: Neural Basis of Social Knowledge. *Annual Review of Psychology*, v. 60, n. 1, p. 693–716, jan. 2009.

AKIYOSHI, Ryohei *et al.* Microglia enhance synapse activity to promote local network synchronization. *eNeuro*, v. 5, n. 5, p. 1–13, 2018.

ALKAM, Tursun *et al.* Restraining tumor necrosis factor-alpha by thalidomide prevents the Amyloid beta-induced impairment of recognition memory in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 189, n. 1, p. 100–106, 2008.

ALMEIDA, R. D. *et al.* Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death and Differentiation*. [S.l.]: Cell Death Differ. , out. 2005

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers. p. 1–48, 2018. Disponível em:

<<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>>.

ALZUHERRI, Hadi; CHANG, Kin Chow. Calcineurin activates NF- $\kappa$ B in skeletal muscle C2C12 cells. v. 15, p. 471–478, 2003.

AMOR, Sandra; NICOLA, M. Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. 2014.

ANDREWS, L. M. *et al.* A population pharmacokinetic model to predict the individual starting dose of tacrolimus in adult renal transplant recipients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 85, n. 3, p. 601–615, 1 mar. 2019.

ANTUNES, M; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*, v. 13, n. 2, p. 93–110, maio 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3332351&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 mar. 2015.

ARENDT, Kristin L. *et al.* Calcineurin mediates homeostatic synaptic plasticity by regulating retinoic acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 42, p. E5744–E5752, 20 out. 2015.

ARIAS, C.; ARRIETA, I.; TAPIA, R.  $\beta$ -Amyloid peptide fragment 25–35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *Journal of Neuroscience Research*, v. 41, n. 4, p. 561–566, 1995.

ARRIGHI, Henry Michael *et al.* Lethality of alzheimer disease and its impact on nursing home placement. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, v. 24, n. 1, p. 90–95, jan. 2010.

ASAI, Akio *et al.* High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 48, p. 34450–34458, 1999.

ASLE-ROUSTA, Masoumeh *et al.* FTY720 (Fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (A $\beta$ 42)- induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 50, n. 3, p. 524–532, 2013.

ATUCHA, Erika; ROOZENDAAL, Benno. The inhibitory avoidance discrimination task to investigate accuracy of memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 9, 12 mar. 2015.

AYTAN, Nurgul *et al.* Fingolimod modulates multiple neuroinflammatory markers in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, v. 6, n. April, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep24939>>.

BABCOCK, Alicia A. *et al.* Cytokine-producing microglia have an altered beta-amyloid load in aged APP/PS1 Tg mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 48, p. 86–101, 2015.

BABULAL, Ganesh M. *et al.* Perspectives on ethnic and racial disparities in Alzheimer's disease and related dementias: Update and areas of immediate need. *Alzheimer's and Dementia*. [S.l.]: Elsevier Inc. , 1 fev. 2019

BAUMGÄRTEL, Karsten; MANSUY, Isabelle M. *Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory. Learning and Memory*. [S.l.]: Learn Mem. , set. 2012

BAUMGARTNER, Gudrun; RENNER, Karl Heinz. Humor in the elderly with dementia: Development and initial validation of a behavioral observation system. *Current Psychology*, p. 1–14, 9 nov. 2019.

BEDIOU, Benoit *et al.* Impaired social cognition in mild alzheimer disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, v. 22, n. 2, p. 130–140, jun. 2009.

BELINSON, Haim *et al.* Activation of the amyloid cascade in apolipoprotein E4 transgenic mice induces lysosomal activation and neurodegeneration resulting in marked cognitive deficits. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 18, p. 4690–4701, 30 abr. 2008.

BELLOZI, Paula Maria Quaglio; GOMES, Giovanni Freitas; DA SILVA, Maria Carolina Machado; *et al.* A positive allosteric modulator of mGluR5 promotes neuroprotective effects in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, v. 160, 1 dez. 2019.

BELLOZI, Paula Maria Quaglio *et al.* Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BEZ235 (dactolisib) on amyloid- $\beta$  1–42 induced neurotoxicity and memory impairment. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

BELLOZI, Paula Maria Quaglio; GOMES, Giovanni Freitas; DE OLIVEIRA, Leonardo Rossi; *et al.* NVP-BEZ235 (dactolisib) has protective effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, n. November, p. 1–11, 2019.

BENDICKOVA, Kamila; TIDU, Federico; FRIC, Jan. Calcineurin–NFAT signalling in myeloid leucocytes: new prospects and pitfalls in immunosuppressive therapy. *EMBO Molecular Medicine*, v. 9, n. 8, p. 990–999, 2017. Disponível em: <<http://embomolmed.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emmm.201707698>>.

BENNETT, Jason *et al.* Tacrolimus Modulates TGF- $\beta$  Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells. *Journal of Clinical Medicine*, v. 5, n. 5, p. 50, 26 abr. 2016.

BERNARDI, Paolo *et al.* The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS Journal*, v. 273, n. 10, p. 2077–2099, 2006.



- BERTI, Valentina *et al.* Mediterranean diet and 3-year Alzheimer brain biomarker changes in middle-aged adults. *Neurology*, v. 90, n. 20, p. E1789–E1798, 15 maio 2018.
- BERTOGLIO, Leandro José; JOCA, Sâmia Regiane Lourenço; GUIMARÃES, Francisco Silveira. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, v. 175, n. 1, p. 183–188, 25 nov. 2006.
- BERTRAM, Lars; TANZI, Rudolph E. Alzheimer disease risk genes: 29 and counting. *Nature Reviews Neurology*, v. 15, n. 4, p. 191–192, 1 abr. 2019.
- BIRD, Chris M. *The role of the hippocampus in recognition memory*. *Cortex*. [S.l.]: Masson SpA. , 1 ago. 2017
- BITO, H; DEISSEROTH, K; TSIEN, R W. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-and stimulus duration-dependent .... *Cell*, v. 87, p. 1203–1214, 1996. Disponível em: <<http://www.cell.com/content/article/abstract?uid=PIIS0092867400809149%5Cnpapers://e99d0f55-0087-40a3-920e-db79636acd40/Paper/p311134>>.
- BLOCK, Michelle L; ZECCA, Luigi; HONG, Jau-Shyong. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 57–69, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17180163>>. Acesso em: 21 jan. 2014.
- BRAZIL, Derek P.; HEMMINGS, Brian A. *Ten years of protein kinase B signalling: A hard Akt to follow*. *Trends in Biochemical Sciences*. [S.l.]: Trends Biochem Sci. , 1 nov. 2001
- BROCHARD, Vanessa *et al.* Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. v. 119, n. 1, 2009.
- BROTHERS, Holly M.; GOSZTYLA, Maya L.; ROBINSON, Stephen R. The physiological roles of amyloid- $\beta$  peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 10, n. APR, p. 1–16, 2018.
- BRÜNE, Martin *et al.* Mental state attribution, neurocognitive functioning, and psychopathology: What predicts poor social competence in schizophrenia best? *Schizophrenia Research*, v. 92, n. 1–3, p. 151–159, maio 2007.
- BRUNET, A.; DATTA, S. R.; GREENBERG, M. E. *Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway*. *Current Opinion in Neurobiology*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 jun. 2001
- BRUNET, Mercè *et al.* Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus-Personalized Therapy. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 41, n. 3, p. 261–307, 1 jun. 2019. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00007691-201906000-00002>>. Acesso em: 2 jun. 2020.
- BRYAN, Kathryn J. *et al.* *Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations*. [S.l.]: CRC Press/Taylor & Francis, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204338>>. Acesso em: 2 jul. 2020.
- BUDD, S. L. *et al.* Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 11, p. 6161–6166, 2000. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.100121097>>.
- BUTCHER, S *et al.* Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. *J Neurosci*, v. 17, n. 18, p. 6939–6946, 1997. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9278529%5Cnpapers3://publication/uuid/20AD98CD-26EA-40A8-AA4F-2250925B1A43](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9278529%5Cnpapers3://publication/uuid/20AD98CD-26EA-40A8-AA4F-2250925B1A43)>.

- BZDOK, Danilo; DUNBAR, Robin I.M. The Neurobiology of Social Distance. *Trends in Cognitive Sciences*, 3 jun. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364661320301406>>. Acesso em: 14 jun. 2020.
- CACCAMO, Antonella *et al.* Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature. *Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 23, p. 7988–7998, 2014.
- CACCAMO, Antonella *et al.* Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- $\beta$ , and Tau: Effects on cognitive impairments. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 17, p. 13107–13120, 2010.
- CACIOPPO, Stephanie; CAPITANIO, John P.; CACIOPPO, John T. *Toward a neurology of loneliness. Psychological bulletin.* [S.l.]: Psychol Bull. , 1 nov. 2014
- CALVO-RODRIGUEZ, Maria *et al.* Increased mitochondrial calcium levels associated with neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2020.
- CANTO-DE-SOUZA, L.; MATTIOLI, R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 130, p. 44–51, 1 abr. 2016.
- CARONE, Marco; ASGHARIAN, Masoud; JEWELL, Nicholas P. Estimating the lifetime risk of dementia in the Canadian elderly population using cross-sectional cohort survival data. *J Am Stat Assoc*, v. 109, n. 505, p. 24–35, 2014.
- CARRERA, Ivan *et al.* Immunocytochemical Characterization of Alzheimer's Disease Hallmarks in APP/PS1 Transgenic Mice Treated with a New Anti-Amyloid- $\beta$ ; Vaccine. *Central Asian Journal of Global Health*, v. 2, n. Suppl, 27 mar. 2014.
- CASAS, Caty *et al.* Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A $\beta$ 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *American Journal of Pathology*, v. 165, n. 4, p. 1289–1300, 2004.
- CATALDO, Janine K.; PROCHASKA, Judith J.; GLANTZ, Stanton A. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's disease: An analysis controlling for tobacco industry affiliation. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 19, n. 2, p. 465–480, 2010.
- CAVALLUCCI, Virve; BERRETTA, Nicola. Calcineurin Inhibition Rescues Early Synaptic Plasticity Deficits in a Mouse Model of Alzheimer ' s Disease. p. 541–548, 2013.
- CHEN, Guo Fang *et al.* Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 38, n. 9, p. 1205–1235, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/aps.2017.28>>.
- CHEN, Qi-Sheng *et al.* Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiology of learning and memory*, v. 77, n. 3, p. 354–71, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991763>>. Acesso em: 26 jan. 2016.
- CHI, Song *et al.* *Depression in Alzheimer's disease: Epidemiology, mechanisms, and management.* *Journal of Alzheimer's Disease.* [S.l.]: IOS Press. , 2014
- CHO, Sun Jung *et al.* SUMO1 promotes A $\beta$  production via the modulation of autophagy. *Autophagy*, v. 11, n. 1, p. 100–112, 1 jan. 2015.
- CHRISTIANS, U. *et al.* Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with

tacrolimus. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 41, n. 11, p. 813–851, 2002.

CHUN, Jerold; HARTUNG, Hans Peter. *Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. Clinical Neuropharmacology*. [S.l.]: Clin Neuropharmacol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20061941/>>. Acesso em: 1 jul. 2020. , mar. 2010

CLARK, Anna K. *et al.* Selective activation of microglia facilitates synaptic strength. *Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 11, p. 4552–4570, 18 mar. 2015.

CLARK, Camilla N. *et al.* Altered Sense of Humor in Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 49, n. 1, p. 111–119, 2015.

CLIPSTONE, N A; CRABTREE, G R. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, v. 357, n. 6380, p. 695–7, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/357695a0>>.

COLETTIS, Natalia C. *et al.* Amnesia of inhibitory avoidance by scopolamine is overcome by previous open-field exposure. *Learning and Memory*, v. 21, n. 11, p. 634–645, 1 nov. 2014.

COLOMBO, Delia; AMMIRATI, E. *Cyclosporine in transplantation - A history of converging timelines. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. [S.l.: s.n.]. , out. 2011

COLOVIC, Mirjana B. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 3, p. 315–335, 25 abr. 2013.

CONGDON, Erin E. *et al.* Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy*, v. 8, n. 4, p. 609–622, 2012.

CONWAY, Myra E. *Alzheimer's disease: targeting the glutamatergic system. Biogerontology*. [S.l.]: Springer. , 1 jun. 2020

CORDER, E. H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 1993.

CRUZ, Celia; CRUZ, Francisco. The ERK 1 and 2 Pathway in the Nervous System: From Basic Aspects to Possible Clinical Applications in Pain and Visceral Dysfunction. *Current Neuropharmacology*, v. 5, n. 4, p. 244–252, 30 nov. 2007.

CUNHA XAVIER PINTO, Mauro *et al.* Glycine transporters type 1 inhibitor promotes brain preconditioning against NMDA-induced excitotoxicity. *Neuropharmacology*, v. 89, p. 274–281, 2015.

D'AMELIO, Marcello *et al.* Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, v. 14, n. 1, p. 69–79, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.2709>>.

DA SILVA, Silvia Viana *et al.* Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 17 jun. 2016.

DAHER, Fernanda; MATTIOLI, Rosana. Impairment in the aversive memory of mice in the inhibitory avoidance task but not in the elevated plus maze through intra-amygdala injections of histamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 135, p. 237–245, 29 jun. 2015.

DANYSZ, Wojciech; PARSONS, Chris G. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: Preclinical evidence. 1 set. 2003, [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 1 set. 2003. p. S23–S32. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gps.938>>. Acesso em: 3 jul. 2020.

DE LA FUENTE, Verónica *et al.* Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: Control on nuclear factor- $\kappa$ B signaling in consolidation and

reconsolidation. *Hippocampus*, v. 24, n. 12, p. 1549–1561, 2014.

DECKER, Jochen Martin *et al.* The Tau/A152T mutation, a risk factor for frontotemporal-spectrum disorders, leads to <scp>NR</scp> 2B receptor-mediated excitotoxicity. *EMBO reports*, v. 17, n. 4, p. 552–569, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/embr.201541439>>. Acesso em: 17 maio 2020.

DEEP, Satya Narayan *et al.* GluN2A-NMDA receptor-mediated sustained Ca<sup>2+</sup> influx leads to homocysteine-induced neuronal cell death. *Journal of Biological Chemistry*, v. 294, n. 29, p. 11154–11165, 19 jul. 2019. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.RA119.008820>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

DETRAIT, E. R. *et al.* Peripheral administration of an anti-TNF- $\alpha$  receptor fusion protein counteracts the amyloid induced elevation of hippocampal TNF- $\alpha$  levels and memory deficits in mice. *Neurochemistry International*, v. 72, n. 1, p. 10–13, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2014.04.001>>.

DETURE, Michael A.; DICKSON, Dennis W. *The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. Molecular Neurodegeneration*. [S.l.]: BioMed Central Ltd. , 2 ago. 2019

DINELEY, Kelly T *et al.* ACUTE INHIBITION OF CALCINEURIN RESTORES ASSOCIATIVE LEARNING AND MEMORY IN Tg2576 APP TRANSGENIC MICE. *Neurobiol Learn Mem.*, v. 88, n. 2, p. 217–224, 2007.

DINELEY, Kelly T *et al.* Amyloid-beta oligomers impair fear conditioned memory in a calcineurin-dependent fashion in mice. *Journal of neuroscience research*, v. 88, n. 13, p. 2923–32, out. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2919647&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

DITZLER, Sally *et al.* A Rapid Neurobehavioral Assessment Reveals that FK506 Delays Symptom Onset in R6 / 2 Huntington ' s Disease Mice. n. August, p. 115–126, 2003.

DODICH, Alessandra *et al.* Differential Impairment of Cognitive and Affective Mentalizing Abilities in Neurodegenerative Dementias: Evidence from Behavioral Variant of Frontotemporal Dementia, Alzheimer's Disease, and Mild Cognitive Impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 50, n. 4, p. 1011–1022, 22 fev. 2016.

DOI, Yukiko *et al.* Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PloS one*, v. 8, n. 4, p. e61988, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3625222&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

DOODY, Rachelle S. *et al.* Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 370, n. 4, p. 311–321, 23 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1312889>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

DORSZEWSKA, Jolanta *et al.* Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, v. 13, n. 9, p. 952–963, 27 jul. 2016.

DOU, Kai Xin *et al.* Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: A network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 10, n. 1, p. 126, 27 dez. 2018. Disponível em: <<https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-018-0457-9>>. Acesso em: 8 jun. 2020.

DOWNWARD, Julian. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt.

*Current Opinion in Cell Biology*, v. 10, n. 2, p. 262–267, 1998.

DUMONT, Francis J.; SU, Qingxiang. *Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin*. *Life Sciences*. [S.l.: s.n.]. , 22 dez. 1995

EDISON, Paul *et al.* Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiology of Disease*, v. 32, n. 3, p. 412–419, dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18786637/>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

EICH, Marie Lisa *et al.* The calcineurin-binding, activity-dependent splice variant dynamin1xb is highly enriched in synapses in various regions of the central nervous system. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 10, p. 230, 25 jul. 2017.

EIMER, William A.; VASSAR, Robert. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Molecular Neurodegeneration*, v. 8, n. 1, p. 2, 14 jan. 2013. Disponível em: <<http://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1326-8-2>>. Acesso em: 9 jun. 2020.

EL-BATAWY, Mohammad Maged Y *et al.* Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of dermatological science*, v. 54, n. 2, p. 76–87, maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19303745>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

EL HAJ, Mohamad; KESSELS, Roy P C. Context memory in Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra*, v. 3, n. 1, p. 342–50, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3884173&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

ENGELHARDT, Britta; RANSOHOFF, Richard M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: Anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in Immunology*, v. 26, n. 9, p. 485–495, 2005.

ESPOSITO, Zaira *et al.* Amyloid  $\beta$ , glutamate, excitotoxicity in alzheimer's disease: Are we on the right track? *CNS Neuroscience and Therapeutics*, v. 19, n. 8, p. 549–555, 2013.

FANG, Wenli *et al.* Neurotrophin reduces memory impairment and neuroinflammation via BDNF/NF-KB in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *American Journal of Translational Research*, v. 11, n. 3, p. 1541–1554, 2019.

FARRIMOND, Lucy E.; ROBERTS, Emmert; MCSHANE, Rupert. *Memantine and cholinesterase inhibitor combination therapy for Alzheimer's disease: A systematic review*. *BMJ Open*. [S.l.]: BMJ Open. , 2012

FENG, Huancun *et al.* Roflumilast ameliorates cognitive impairment in APP/PS1 mice via cAMP/CREB/BDNF signaling and anti-neuroinflammatory effects. *Metabolic Brain Disease*, v. 34, n. 2, p. 583–591, 15 abr. 2019.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, Paz *et al.*  $\beta$ -amyloid<sub>25-35</sub>inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: Modulation of uptake as a survival mechanism. *Neurobiology of Disease*, v. 15, n. 3, p. 580–589, 2004.

FIELDS, Jerel A. *et al.* Neuroprotective effects of the immunomodulatory drug FK506 in a model of HIV1-gp120 neurotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0585-8>>.

FINDLEY, Caleigh A. *et al.* *Amyloid Beta-Related Alterations to Glutamate Signaling Dynamics During Alzheimer's Disease Progression*. *ASN Neuro*. [S.l.]: SAGE Publications Inc. , 1 jun. 2019

FITZGERALD, Daniel J.; BURGOYNE, Robert D.; HAYNES, Lee P. Neuronal calcium sensor proteins are unable to modulate NFAT activation in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1780, n. 2, p. 240–248, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.10.011>>.

FITZNER, Dirk *et al.* Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of cell science*, v. 124, n. Pt 3, p. 447–58, 1 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242314>>. Acesso em: 7 mar. 2016.

FRANKLIN, Keith; PAXINOS, George. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. The Coronal Plates and Diagrams*. [S.l.]: Academic Press, 2008.

FREDERICK, Christelle *et al.* Rapamycin ester analog CCI-779/Temsirolimus alleviates tau pathology and improves motor deficit in mutant tau transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 44, n. 4, p. 1145–1156, 2015.

FRICKER, Michael *et al.* *Neuronal cell death. Physiological Reviews*. [S.l.]: American Physiological Society, 1 abr. 2018

FRIEDRICH, R. P. *et al.* Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A $\beta$  pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 5, p. 1942–1947, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904532106>>.

FROST, Georgia R.; JONAS, Lauren A.; LI, Yue Ming. *Friend, Foe or Both? Immune Activity in Alzheimer's Disease. Frontiers in Aging Neuroscience*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 1 jul. 2020, 10 dez. 2019

FUKUMOTO, Kazuya *et al.* Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid  $\beta$ -induced memory impairment. *Behavioural brain research*, v. 268, p. 88–93, 15 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713151>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

FURMAN, Jennifer L; NORRIS, Christopher M. Calcineurin and glial signaling : neuroinflammation and beyond. p. 1–12, 2014.

GABBITA, S. P. *et al.* Early intervention with a small molecule inhibitor for tumor necrosis factor- $\alpha$  prevents cognitive deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, v. 9, n. 151, p. 1–16, 2012.

GALEANO, Pablo *et al.* Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 8, n. SEP, p. 321, 16 set. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00321/abstract>>. Acesso em: 1 jun. 2020.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* *Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death and Differentiation*. [S.l.]: Nature Publishing Group, 1 mar. 2018

GEERTS, Hugo; GROSSBERG, George T. *Pharmacology of acetylcholinesterase inhibitors and N-methyl-D-aspartate receptors for combination therapy in the treatment of Alzheimer's disease. Journal of Clinical Pharmacology*. [S.l.]: J Clin Pharmacol, jul. 2006

GEORGE-HYSLOP, P. St *et al.* Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nature Genetics*, v. 2, n. 4, p. 330–334, 1992.

GILHUS, Nils Erik; DEUSCHL, Günther. Neuroinflammation — a common thread in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, v. 15, n. 8, p. 429–430, 2019.

GIOVANNINI, Maria Grazia *et al.*  $\beta$ -amyloid-induced inflammation and cholinergic

hypofunction in the rat brain in vivo: Involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiology of Disease*, v. 11, n. 2, p. 257–274, 2002.

GLABE, C. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 17, n. 2, p. 137–145, 2001.

GOATE, Alison *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, v. 349, n. 6311, p. 704–706, 1991.

GOLDMANN, Tobias *et al.* Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature Immunology*, v. 17, n. 7, p. 797–805, 21 jun. 2016. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC4968048/?report=abstract>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

GONZÁLEZ-SALINAS, Sofía *et al.* Retrieval of Inhibitory Avoidance Memory Induces Differential Transcription of *arc* in Striatum, Hippocampus, and Amygdala. *Neuroscience*, v. 382, p. 48–58, 1 jul. 2018.

GOTO, Satoshi *et al.* The Distribution of Calcineurin in Rat Brain by Light and Electron Microscopic Immunohistochemistry and Enzyme-Immunoassay Cerebral hemitransection. v. 397, p. 161–172, 1986.

GOTTESMAN, Reena T.; STERN, Yaakov. Behavioral and psychiatric symptoms of dementia and rate of decline in Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, n. SEP, p. 1062, 24 set. 2019.

GÖTZ, Jürgen; ITTNER, Lars M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 9, n. 7, p. 532–44, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568014>>. Acesso em: 8 set. 2015.

GOWER, Alma J.; LAMBERTY, Yves. The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. *Behavioural Brain Research*, v. 57, n. 2, p. 163–173, 30 nov. 1993.

GRIMM, Marcus O W *et al.* Neprilysin and A $\beta$  Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, v. 5, p. 98, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3870290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

GUO, Liying *et al.* Elevating calcium in Th2 cells activates multiple pathways to induce IL-4 transcription and mRNA stabilization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 181, n. 6, p. 3984–93, 15 set. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2744309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

HAMANO, Tadanori *et al.* Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *European Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 5, p. 1119–1130, mar. 2008.

HAN, Xiao Jian *et al.* Amyloid  $\beta$ -42 induces neuronal apoptosis by targeting mitochondria. *Molecular Medicine Reports*, v. 16, n. 4, p. 4521–4528, 1 out. 2017.

HANISCH, Uwe-Karsten; KETTENMANN, Helmut. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, v. 10, n. 11, p. 1387–94, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965659>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

HANSEN, Henrik H. *et al.* Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiology of Disease*, v. 16, n. 2, p. 440–453, jul. 2004.

- HANSEN, David V.; HANSON, Jesse E.; SHENG, Morgan. *Microglia in Alzheimer's disease*. *Journal of Cell Biology*. [S.l.]: Rockefeller University Press. , 1 fev. 2018
- HARDY, John; SELKOE, Dennis J. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics*. *Science*. [S.l.]: American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/297/5580/353>>. Acesso em: 2 jul. 2020. , 19 jul. 2002
- HAUNG YU, W. *et al.* Macroautophagy - A novel  $\beta$ -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Biology*, v. 171, n. 1, p. 87–98, out. 2005.
- HE, Ping *et al.* Long-Term Treatment of Thalidomide Ameliorates Amyloid-Like Pathology through Inhibition of  $\beta$ -Secretase in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, 2013.
- HEMMATI, Fatemeh *et al.* Neurorestorative effect of FTY720 in a rat model of Alzheimer's disease: Comparison with Memantine. *Behavioural Brain Research*, v. 252, p. 415–421, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.016>>.
- HENEKA, Michael T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. [S.l.]: Lancet Publishing Group. , 1 abr. 2015
- HENRY, Julie D. *et al.* Clinical assessment of social cognitive function in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 jan. 2016
- HICKEY, W. F.; HSU, B. L.; KIMURA, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, v. 28, n. 2, p. 254–260, 1991.
- HICKMAN, Suzanne E.; ALLISON, Elizabeth K.; EL KHOURY, Joseph. Microglial dysfunction and defective  $\beta$ -amyloid clearance pathways in aging alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 33, p. 8354–8360, 2008a.
- HICKMAN, Suzanne E.; ALLISON, Elizabeth K.; EL KHOURY, Joseph. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 28, n. 33, p. 8354–60, 13 ago. 2008b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2597474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 dez. 2015.
- HLIŇÁK, Zdeněk; KREJČÍ, Ivan. Concurrent administration of subeffective doses of scopolamine and MK- 801 produces a short-term amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 91, n. 1–2, p. 83–89, mar. 1998.
- HOGAN, Patrick G *et al.* Transcriptional regulation by calcium , calcineurin , and NFAT. n. 617, p. 2205–2232, 2003.
- HONG, Hyun Seok *et al.* FK506 reduces amyloid plaque burden and induces MMP-9 in A $\beta$ PP/PS1 double transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 22, n. 1, p. 97–105, 2010.
- HUANG, Huang *et al.* Characterization of AD-like phenotype in aged APPSwe/PS1dE9 mice. *Age*, v. 38, n. 4, p. 303–322, 1 ago. 2016.
- INOUE, Keiichi *et al.* Macroautophagy deficiency mediates age-dependent neurodegeneration through a phospho-tau pathway. *Molecular Neurodegeneration*, v. 7, n. 1, 2012.
- ITTNER, Lars M. *et al.* Dendritic function of tau mediates amyloid- $\beta$  toxicity in alzheimer's disease mouse models. *Cell*, v. 142, n. 3, p. 387–397, 2010.



IWASAKI, Kazuhide *et al.* Distribution , Metabolism and Excretion Tacrolimus ( FK506 ) in the Rat of Takehisa HATA , Shinichi NINOMIYA \*, and Yoshio EsuMI \* Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Fujisawa Pharmaceutical Co ., Ltd ., Osaka ; \* Tokai Laboratories Pure Chemicals Co .,. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v. 13, p. 259–265, 1998.

IZQUIERDO, I. *et al.* Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats. *European Journal of Neuroscience*, v. 9, n. 4, p. 786–793, abr. 1997.

JAKARIA, Md *et al.* Neurotoxic Agent-Induced Injury in Neurodegenerative Disease Model: Focus on Involvement of Glutamate Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 2 jul. 2020. , 29 ago. 2018

JAN, Asad *et al.* A $\beta$ 42 neurotoxicity is mediated by ongoing nucleated polymerization process rather than by discrete A $\beta$ 42 species. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 10, p. 8585–8596, 11 mar. 2011.

JANKOWSKY, Joanna L *et al.* Mutant Presenilins Specifically Elevate the Levels of the 42 Residue Beta-Amyloid Peptide in Vivo: Evidence for Augmentation of a 42-specific Gamma Secretase. *Human Molecular Genetics*, v. 13, n. 2, p. 159–170, 2004. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/parkinson-disease>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

JANSEN, Iris E. *et al.* Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nature Genetics*, v. 51, n. 3, p. 404–413, 1 mar. 2019.

JEZEK, K; WESIERSKA, M; FENTON, A A. Hippocampus-dependent Retrieval and Hippocampus-Independent Extinction of Place Avoidance Navigation, and Stress-Induced Out-Of-Context Activation of a Memory Revealed by Reversible Lesion Experiments in Rats - PubMed. *Physiological research*, v. 51, n. 1, p. 35–47, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12479785/>>. Acesso em: 1 jun. 2020.

JIANG, Shangdong *et al.* Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, v. 9, p. 6, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3891995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

JIANG, Teng *et al.* Temsirolimus promotes autophagic clearance of amyloid- $\beta$  and provides protective effects in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, v. 81, p. 54–63, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.02.008>>.

JIANG, Xueying *et al.* The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, v. 94, n. 3, p. 713–722, ago. 2005.

JIAO, S. S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*, v. 6, n. 10, p. e907–e907, 4 out. 2016.

JOSHI, Pooja *et al.* Fingolimod Limits Acute A $\beta$  Neurotoxicity and Promotes Synaptic Versus Extrasynaptic NMDA Receptor Functionality in Hippocampal Neurons. *Scientific Reports*, v. 7, n. December 2016, p. 1–15, 2017.

JUNG, Goo Lee *et al.* Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in elderly Korean with dementia. *Psychiatry Investigation*, v. 6, n. 4, p. 299–305, dez. 2009.

KACZOROWSKI, Catherine C.; DISTERHOFT, John F. Memory deficits are associated with impaired ability to modulate neuronal excitability in middle-aged mice. *Learning and Memory*,

v. 16, n. 6, p. 362–366, 1 jun. 2009.

KADOWAKI, H. *et al.* Amyloid  $\beta$  induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death and Differentiation*, v. 12, n. 1, p. 19–24, 2005.

KAPPOS, Ludwig *et al.* A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, v. 362, n. 5, p. 387–401, 4 fev. 2010.

KARIN, M; TIAN, J. Stimulation of ELK1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 21, p. 15173–15180, 1999.

KARPERIEN, Audrey; AHAMMER, Helmut; JELINEK, Herbert F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 7, n. January, p. 1–18, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00003/abstract>>.

KASHYAP, G. *et al.* Synapse loss and progress of Alzheimer's disease -A network model. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2019.

KE, Hengming; HUAI, Qing. Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 311, n. 4, p. 1095–102, 28 nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623295>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

KEMPURAJ, D *et al.* Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *Journal of neurology, neurosurgery and spine*, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28127589>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5260818>>.

KEMPURAJ, Duraisamy *et al.* Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, n. July, p. 1–16, 2017.

KETTENMANN, H. *et al.* Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, v. 91, n. 2, p. 461–553, 2011. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00011.2010>>.

KETTENMANN, Helmut; KIRCHHOFF, Frank; VERKHRATSKY, Alexei. Perspective Microglia : New Roles for the Synaptic Stripper. 2012.

KIM, Cunyoen *et al.* Association between a change in social interaction and dementia among elderly people. *International Journal of Gerontology*, v. 10, n. 2, p. 76–80, 1 jun. 2016.

KIM, Seonil; ZIFF, Edward B. Calcineurin Mediates Synaptic Scaling Via Synaptic Trafficking of Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA Receptors. *PLoS Biology*, v. 12, n. 7, p. e1001900, 1 jul. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1001900>>. Acesso em: 1 jun. 2020.

KIVIPELTO, Miia *et al.* Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, v. 62, n. 10, p. 1556–1560, 1 out. 2005.

KIYOTA, Tomomi *et al.* CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *The FASEB Journal*, v. 24, n. 8, p. 3093–3102, ago. 2010.

KLEE, Claude B; REN, Hao; WANG, Xutong. Regulation of the Calmodulin- stimulated Protein Phosphatase , Calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 22, p. 3367–13370, 1998.

KOH, Ming Teng; SPIEGEL, Amy M.; GALLAGHER, Michela. Age-associated changes in hippocampal-dependent cognition in Diversity Outbred mice. *Hippocampus*, v. 24, n. 11, p.

1300–1307, 1 nov. 2014.

KOLE, A. J.; ANNIS, R. P.; DESHMUKH, M. *Mature neurons: equipped for survival. Cell death & disease*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 27 jun. 2013

KOMADA, Munekazu; TAKAO, Keizo; MIYAKAWA, Tsuyoshi. Elevated plus maze for mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, n. 22, p. 2007–2009, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 dez. 2013.

KOPEC, Brian *et al.* Non-invasive Brain Delivery and Efficacy of BDNF in APP/PS1 Transgenic Mice. *Medical Research Archives*, v. 8, n. 2, 21 fev. 2020.

KRABBE, Grietje *et al.* Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS one*, v. 8, n. 4, p. e60921, jan. 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3620049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

KRAFFT, Grant A.; KLEIN, William L. ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, v. 59, n. 4–5, p. 230–242, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.07.012>>.

KRAPIVINSKY, Grigory *et al.* The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*, v. 40, n. 4, p. 775–784, 13 nov. 2003.

KREMENCHUTZKY, Marcelo *et al.* Impact of prior treatment status and reasons for discontinuation on the efficacy and safety of fingolimod: Subgroup analyses of the Fingolimod Research Evaluating Effects of Daily Oral Therapy in Multiple Sclerosis (FREEDOMS) study. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v. 3, n. 3, p. 341–349, 2014.

KRISTIANSEN, M.; HAM, J. *Programmed cell death during neuronal development: The sympathetic neuron model. Cell Death and Differentiation*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 2014

KRITIS, Aristeidis A. *et al.* Researching glutamate  $\alpha$  induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 9, n. March, p. 1–18, 2015. Disponível em: <[http://www.frontiersin.org/Cellular\\_Neuroscience/10.3389/fncel.2015.00091/abstract](http://www.frontiersin.org/Cellular_Neuroscience/10.3389/fncel.2015.00091/abstract)>.

KRYPTOS, Angelos-Miltiadis. Avoidance learning: a review of theoretical models and recent developments. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 9, n. July, p. 189, 21 jul. 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2015.00189/abstract>>. Acesso em: 1 jun. 2020.

KUNKLE, Brian W. *et al.* Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nature Genetics*, v. 51, n. 3, p. 414–430, 1 mar. 2019.

LACOR, Pascale N. *et al.* A $\beta$  oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 4, p. 796–807, 24 jan. 2007.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, v. 25, n. 1, p. 59–70, 1 jan. 2018.

LEDOUX, J. E. *et al.* *The birth, death and resurrection of avoidance: A reconceptualization of a troubled paradigm. Molecular Psychiatry*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 jan. 2017

LEE, Eunbeol; CHUNG, Won Suk. Glial control of synapse number in healthy and diseased

brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, n. February, p. 1–8, 2019.

LEE, Hee Jae *et al.* Diabetes and Alzheimer's Disease: Mechanisms and Nutritional Aspects. *Clinical Nutrition Research*, v. 7, n. 4, p. 229, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6209735/?report=abstract>. Acesso em: 1 jul. 2020.

LEE, Jong Kil *et al.* Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Experimental Medicine*, v. 211, n. 8, p. 1551–1570, 2014.

LEE, Jun Young *et al.* Illiteracy and the incidence of Alzheimer's disease in the Yonchon County survey, Korea. *International Psychogeriatrics*, v. 20, n. 5, p. 976–985, out. 2008.

LEONG, Yong Qi *et al.* Mechanisms of action of amyloid-beta and its precursor protein in neuronal cell death. *Metabolic Brain Disease*. [S.l.]: Springer. , 1 jan. 2020

LEWERENZ, Jan; MAHER, Pamela. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? *Frontiers in Neuroscience*, v. 9, n. DEC, p. 1–20, 2015.

LI, Hao; WEI, Yun. Application of APP/PS1 Transgenic Mouse Model for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, v. 05, n. 03, p. 1–4, 14 dez. 2015.

LI, Lu; STEFAN, Melanie I.; LE NOVÈRE, Nicolas. Calcium Input Frequency, Duration and Amplitude Differentially Modulate the Relative Activation of Calcineurin and CaMKII. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.

LI, Luming *et al.* A Comparative Study of Five Mouse Models of Alzheimer's Disease: Cell Cycle Events Reveal New Insights into Neurons at Risk for Death. *International Journal of Alzheimer's Disease*, v. 2011, 2011.

LI, Xiao-Ling *et al.* Behavioral and Psychological Symptoms in Alzheimer's Disease. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/927804>>.

LIN, Ai Ling *et al.* Chronic rapamycin restores brain vascular integrity and function through NO synthase activation and improves memory in symptomatic mice modeling Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 33, n. 9, p. 1412–1421, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2013.82>>.

LIN, Ai Ling *et al.* Rapamycin rescues vascular, metabolic and learning deficits in apolipoprotein E4 transgenic mice with pre-symptomatic Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 37, n. 1, p. 217–226, 2017.

LIN, Chih Hung *et al.* Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 5, p. 1574–1579, 1 mar. 2003.

LIN, Wei *et al.* The role of TLR2/JNK/NF- $\kappa$ B pathway in amyloid  $\beta$  peptide-induced inflammatory response in mouse NG108-15 neural cells. *International immunopharmacology*, v. 17, n. 3, p. 880–4, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126115>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

LIN, Xiaoyang *et al.* Vaccination induced changes in pro-inflammatory cytokine levels as an early putative biomarker for cognitive improvement in a transgenic mouse model for Alzheimer disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 10, n. 7, p. 2024–2031, 7 jul. 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/hv.28735>>. Acesso em: 9 jun. 2020.

LISTER, R G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, v. 92, n. 2, p. 180–5, jan. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110839>>. Acesso em: 8 dez. 2015.

LIU, J *et al.* Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506

complexes. *Cell*, v. 66, n. 4, p. 807–15, 23 ago. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715244>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

LIU, Jinping *et al.* The role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, v. 13, n. FEB, p. 1–22, 2019.

LIU, Jinping; GAO, Xiulai; WU, Yan. N-Methyl-D-Aspartate Receptors Mediate Excitotoxicity in Amyloid Beta-Induced Synaptic Pathology of Alzheimer's Disease. *Neuroembryology and Aging*, v. 5, n. 4, p. 134–143, 2008. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/193851>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

LIU, Yitao *et al.* NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 11, p. 2846–2857, 14 mar. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360906/>>. Acesso em: 3 jul. 2020.

LIVINGSTON, Gill *et al.* The Lancet Commissions Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet*, v. 390, p. 2673–2734, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/>>.

LOK, Kenghoe *et al.* Characterization of the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease in senescence accelerated background. *Neuroscience Letters*, v. 557, n. PB, p. 84–89, 17 dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24176881/>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

LUEPTOW, Lindsay M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *Journal of Visualized Experiments*, v. 2017, n. 126, 1 ago. 2017.

LUO, C *et al.* Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 17, p. 8907–8912, 1996.

LUO, Hongbo R. *et al.* Akt as a mediator of cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 20, p. 11712–11717, 30 set. 2003.

LUSTBADER, Joyce W. *et al.* Aβ Directly Links Aβ to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. *Science*, v. 304, n. 5669, p. 448–452, 16 abr. 2004.

M, Méndez-Armenta *et al.* Oxidative Stress Associated With Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, 2014.

MACIAN, Fernando. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews. Immunology*, v. 5, n. 6, p. 472–84, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928679>>.

MAEDA, Sumihiro *et al.* Expression of A152T human tau causes age-dependent neuronal dysfunction and loss in transgenic mice. *EMBO reports*, v. 17, n. 4, p. 530–551, 2016.

MALLERET, Gaël *et al.* Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell*, v. 104, n. 5, p. 675–686, 9 mar. 2001.

MANSUY, Isabelle M. Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory. p. 375–384, 2012.

MARKOVIC, Darko S. *et al.* Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 64, n. 9, p. 754–762, 2005.

MATSUNAGA, Shinji; KISHI, Taro; IWATA, Nakao. Memantine monotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, v. 10, n. 4, p. e0123289, 10 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25860130>>. Acesso em: 8 jun.

2020.

MATTHEWS, Dawn C. *et al.* Physical Activity, Mediterranean Diet and Biomarkers-Assessed Risk of Alzheimer's: A Multi-Modality Brain Imaging Study. *Advances in Molecular Imaging*, v. 04, n. 04, p. 43–57, 2014.

MATTSON, M. P. *et al.*  $\beta$ -Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *Journal of Neuroscience*, v. 12, n. 2, p. 376–389, 1 fev. 1992. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/12/2/376>>. Acesso em: 3 jul. 2020.

MENG, Xue *et al.* Association between increased levels of amyloid- $\beta$  oligomers in plasma and episodic memory loss in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 11, n. 1, p. 89, 25 out. 2019. Disponível em: <<https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-019-0535-7>>. Acesso em: 31 maio 2020.

MIGHELLI, Antonio *et al.* A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after: In situ end labeling of DNA strand breaks. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 53, n. 6, p. 606–616, 1994.

MIRANDA, Magdalena *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 7 ago. 2019

MIZUSHIMA, Noboru. A(beta) generation in autophagic vacuoles. *The Journal of cell biology*, v. 171, n. 1, p. 15–7, 10 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216920>>. Acesso em: 26 maio 2020.

MOHMMAD ABDUL, Hafiz *et al.* Proteolysis of calcineurin is increased in human hippocampus during mild cognitive impairment and is stimulated by oligomeric Abeta in primary cell culture. *Aging cell*, v. 10, n. 1, p. 103–13, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3021581&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

MOKHTAR, Sara H *et al.* The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. *International journal of Alzheimer's disease*, v. 2013, p. 910502, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3876695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

MORIMOTO, Keiko; NAKAJIMA, Kazunori. *Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System*. *Frontiers in Neuroscience*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 3 set. 2019

MORRIS, J. C. *et al.* Harmonized diagnostic criteria for Alzheimer's disease: recommendations. *Journal of Internal Medicine*, v. 275, n. 3, p. 204–213, 1 mar. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/joim.12199>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

MULKEY, Rosel M. *et al.* Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, v. 369, n. 6480, p. 486–488, 1994.

MURAKAMI, Yoshihiro *et al.* Pharmacokinetic animal PET study of FK506 as a potent neuroprotective agent. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 45, n. 11, p. 1946–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534067>>.

MUSSON, R E A; SMIT, N P M. Regulatory mechanisms of calcineurin phosphatase activity. *Current medicinal chemistry*, v. 18, n. 2, p. 301–15, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21110798>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

- MUTLU, Oguz *et al.* 7-NI and ODQ disturbs memory in the elevated plus maze, morris water maze, and radial arm maze tests in mice. *Drug Target Insights*, v. 9, p. 1–8, 2015.
- NABESHIMA, Toshitaka; NITTA, Atsumi. Memory Impairment and Neuronal Dysfunction Induced by  $\beta$ -Amyloid Protein in Rats. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 174, n. 3, p. 241–249, 1994.
- NAGAMOTO-COMBS, Kumi; COMBS, Colin K. Microglial phenotype is regulated by activity of the transcription factor, NFAT. *J Neurosci*, v. 30, n. 28, p. 9641–9646, 2010.
- NAZARIAN, Alireza; YASHIN, Anatoliy I.; KULMINSKI, Alexander M. Genome-wide analysis of genetic predisposition to Alzheimer's disease and related sex disparities. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 11, n. 1, 12 jan. 2019.
- NEFF, Ellen P. *Animal models of Alzheimer's disease embrace diversity*. *Lab Animal*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <[www.nature.com/laband](http://www.nature.com/laband)>. Acesso em: 2 jul. 2020. , 1 set. 2019
- NESTOR, Peter J.; FRYER, Tim D.; HODGES, John R. Declarative memory impairments in Alzheimer's disease and semantic dementia. *NeuroImage*, v. 30, n. 3, p. 1010–1020, 15 abr. 2006.
- NICHOLS, Emma *et al.* Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, v. 18, n. 1, p. 88–106, 2019.
- NILSSON, Per *et al.* Autophagy-related protein 7 deficiency in amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) precursor protein transgenic mice decreases A $\beta$  in the multivesicular bodies and induces A $\beta$  accumulation in the golgi. *American Journal of Pathology*, v. 185, n. 2, p. 305–313, 2015.
- NILSSON, Per; SAIDO, Takaomi C. Dual roles for autophagy: Degradation and secretion of Alzheimer's disease A $\beta$  peptide. *BioEssays*, v. 36, n. 6, p. 570–578, jun. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201400002>>. Acesso em: 26 maio 2020.
- NIMMERJAHN, Axel; KIRCHHOFF, Frank; HELMCHEN, Fritjof. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, v. 308, n. 5726, p. 1314–8, 27 maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831717>>. Acesso em: 8 nov. 2013.
- NINOMIYA-TSUJI, J *et al.* The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, v. 398, n. 6724, p. 252–256, 1999.
- NITRINI, Ricardo *et al.* *Prevalence of dementia in Latin America: A collaborative study of population-based cohorts*. *International Psychogeriatrics*. [S.l.]: Int Psychogeriatr. , ago. 2009
- NIU, H. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. v. 32, n. 8, 2017.
- NOVELLINO, Fabiana *et al.* *Innate immunity: A common denominator between neurodegenerative and neuropsychiatric diseases*. *International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 fev. 2020
- O' NEILL, Cora. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*, v. 48, n. 7, p. 647–53, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470275>>. Acesso em: 27 jan. 2016.
- OBULESU, M.; LAKSHMI, M. Jhansi. *Apoptosis in Alzheimer's Disease: An Understanding of the Physiology, Pathology and Therapeutic Avenues*. *Neurochemical Research*. [S.l.]: Springer New York LLC. , 25 nov. 2014

ODDO, Salvatore *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*, v. 39, n. 3, p. 409–421, 31 jul. 2003.

OZCELIK, Sefika *et al.* Rapamycin Attenuates the Progression of Tau Pathology in P301S Tau Transgenic Mice. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. 2–8, 2013.

PANNELL, Maria *et al.* The subpopulation of microglia sensitive to neurotransmitters/neurohormones is modulated by stimulation with LPS, interferon- $\gamma$ , and IL-4. *Glia*, v. 62, n. 5, p. 667–79, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24504982>>. Acesso em: 18 abr. 2016.

PANZA, Francesco *et al.* A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30610216/>>. Acesso em: 1 jul. 2020. , 1 fev. 2019

PAOLETTI, Pierre; BELLONE, Camilla; ZHOU, Qiang. NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <[www.nature.com/reviews/neuro](http://www.nature.com/reviews/neuro)>. Acesso em: 3 jul. 2020. , 1 jan. 2013

PAOURI, Evi *et al.* Peripheral tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\beta$ ) modulates amyloid pathology by regulating blood-derived immune cells and glial response in the brain of AD/TNF transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 20, p. 5155–5171, 2017.

PARKHURST, Christopher N. *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, v. 155, n. 7, p. 1596–1609, 19 dez. 2013.

PARPURA-GILL, Aleksandra; BEITZ, Donald; UEMURA, Etsuro. The inhibitory effects of  $\beta$ -amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. *Brain Research*, v. 754, n. 1–2, p. 65–71, 1997.

PARSONS, Chris G. *et al.* Memantine and cholinesterase inhibitors: Complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotoxicity Research*. [S.l.]: Neurotox Res. , out. 2013

PATEL, Aarti N.; JHAMANDAS, Jack H. Neuronal receptors as targets for the action of amyloid-beta protein (A $\beta$ ) in the brain. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 14, n. January, 2012.

PATEL, Nikunj S. *et al.* Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, v. 2, n. 1, p. 9–9, 11 mar. 2005.

PENDLEBURY, Sarah T.; ROTHWELL, Peter M. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, v. 8, n. 11, p. 1006–1018, nov. 2009.

PENKE, Botond; BOGÁR, Ferenc; F L, Lívía.  $\beta$ -amyloid and the pathomechanisms of Alzheimer's disease: A comprehensive view. *Molecules*, v. 22, n. 10, 2017.

PENTKOWSKI, Nathan S. *et al.* Anxiety-like behavior as an early endophenotype in the TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 61, p. 169–176, 1 jan. 2018.

PETER, Jessica *et al.* Gray matter atrophy pattern in elderly with subjective memory impairment. *Alzheimer's and Dementia*, v. 10, n. 1, p. 99–108, jan. 2014.

PHILLIPS, Emma C. *et al.* Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*. [S.l.]: Portland Press Ltd. , 1 out. 2014



PHILLIPS, Louise H. *et al.* Emotion Perception in Alzheimer's Disease and Mood Disorder in Old Age. *Psychology and Aging*, v. 25, n. 1, p. 38–47, mar. 2010.

PIVOVAROVA, N. B. Excitotoxic Calcium Overload in a Subpopulation of Mitochondria Triggers Delayed Death in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 24, p. 5611–5622, 2004. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0531-04.2004>>.

PIVOVAROVA, Natalia B.; ANDREWS, S. Brian. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J*, v. 277, n. 18, p. 3622–3636, 2012.

PLÁTENÍK, Jan *et al.* GSK3 $\beta$ , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with alzheimer's disease and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 50, p. 83–93, 3 abr. 2014.

PRENTICE, Howard; MODI, Jigar Pravinchandra; WU, Jang Yen. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, 2015.

PRINZ, Marco; PRILLER, Josef. *The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease*. *Nature Neuroscience*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28092660/>>. Acesso em: 1 jul. 2020. , 1 fev. 2017

PROFENNO, Louis A.; PORSTEINSSON, Anton P.; FARAONE, Stephen V. Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders. *Biological Psychiatry*, v. 67, n. 6, p. 505–512, 15 mar. 2010.

QUERFURTH, Henry W; LAFERLA, Frank M. Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, v. 362, n. 4, p. 329–44, 28 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107219>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

RA, Nixon *et al.* Extensive Involvement of Autophagy in Alzheimer Disease: An Immuno-Electron Microscopy Study. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, v. 64, n. 2, 2005.

RABINOVICI, Gil D. *Late-onset Alzheimer disease*. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*. [S.l.]: Lippincott Williams and Wilkins. , 1 fev. 2019

RAHMAN, A; GRUNDKE-IQBAL, I; IQBAL, K. PP2B isolated from human brain preferentially dephosphorylates Ser-262 and Ser-396 of the Alzheimer disease abnormally hyperphosphorylated tau. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, v. 113, n. 2, p. 219–30, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15959850>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

RAIVICH, Gennadij. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends in neurosciences*, v. 28, n. 11, p. 571–3, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16165228>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

RANSOHOFF, Richard M.; BROWN, Melissa A. *Innate immunity in the central nervous system*. *Journal of Clinical Investigation*. [S.l.]: American Society for Clinical Investigation. , 2 abr. 2012

RANSOHOFF, Richard M.; ENGELHARDT, Britta. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 9, p. 623–635, 2012.

RAO, A; LUO, C; HOGAN, P G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual review of immunology*, v. 15, p. 707–747, 1997.

RAO, V K; CARLSON, E A; YAN, S S. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, v. 8, n. 1842, p. 1267–1272, 2014.

REBOLA, Nelson; SRIKUMAR, Bettadapura N.; MULLE, Christophe. *Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors*. *Journal of Physiology*. [S.l.]: Wiley-Blackwell. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2821550/?report=abstract>>. Acesso em: 3 jul. 2020. , jan. 2010

REESE, Lindsay C *et al.* Dysregulated phosphorylation of Ca(2+) /calmodulin-dependent protein kinase II- $\alpha$  in the hippocampus of subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, v. 119, n. 4, p. 791–804, nov. 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4021864&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

REESE, Lindsay C *et al.* Selective induction of calcineurin activity and signaling by oligomeric amyloid beta. *Aging cell*, v. 7, n. 6, p. 824–35, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2954114&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

REESE, Lindsay C; TAGLIALATELA, Giulio. A Role for Calcineurin in Alzheimer ' s Disease. p. 685–692, 2011.

REESE, Lindsay C; TAGLIALATELA, Giulio. Neuroimmunomodulation by Calcineurin in Aging and Alzheimer ' s Disease. v. 1, n. 3, p. 245–253, 2010.

ROBERSON, Erik D. *et al.* Reducing endogenous tau ameliorates amyloid  $\beta$ -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, v. 316, n. 5825, p. 750–754, 2007.

ROBERSON, Erik D; MUCKE, Lennart. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science (New York, N. Y.)*, v. 314, n. 5800, p. 781–4, 3 nov. 2006. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3544944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 fev. 2016.

ROBINSON, Ari *et al.* Upregulation of PGC-1 $\alpha$  expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. *Aging cell*, v. 13, n. 2, p. 263–72, abr. 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4331788&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

ROCHA, Natália Pessoa *et al.* Peripheral blood mono-nuclear cells derived from Alzheimer's disease patients show elevated baseline levels of secreted cytokines but resist stimulation with  $\beta$ -amyloid peptide. *Molecular and cellular neurosciences*, v. 49, n. 1, p. 77–84, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971579>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

ROGERS, Justin T. *et al.* CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 45, p. 16241–16250, 9 nov. 2011.

ROHN, Troy T. *et al.* Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Disease*, v. 11, n. 2, p. 341–354, 2002.

ROJANATHAMMANEE, Lalida *et al.* Attenuation of microglial activation in a mouse model of Alzheimer's disease via NFAT inhibition. *Journal of Neuroinflammation*, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2015.

ROMBERG, Carola *et al.* False recognition in a mouse model of Alzheimer's disease:

Rescue with sensory restriction and memantine. *Brain*, v. 135, n. 7, p. 2103–2114, 2012.

RONAY, Richard; VON HIPPEL, William. Sensitivity to Changing Contingencies Predicts Social Success. *Social Psychological and Personality Science*, v. 6, n. 1, p. 23–30, 11 jan. 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1948550614542348>>. Acesso em: 9 jun. 2020.

RÖNICKE, Raik *et al.* Early neuronal dysfunction by amyloid  $\beta$  oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiology of Aging*, v. 32, n. 12, p. 2219–2228, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.011>>.

ROSELLI, F. *et al.* Soluble  $\beta$ -amyloid1-40 induces NMDA-Dependent Degradation of Postsynaptic Density-95 at Glutamatergic Synapses. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 48, p. 11061–11070, 30 nov. 2005. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/25/48/11061>>. Acesso em: 3 jul. 2020.

ROZKALNE, Anete; HYMAN, Bradley T; SPIRES-JONES, Tara L. Calcineurin inhibition with FK506 ameliorates dendritic spine density deficits in plaque-bearing Alzheimer model mice. *Neurobiology of disease*, v. 41, n. 3, p. 650–4, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3031746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

RUBINSZTEIN, David C. *et al.* *Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair.* *Autophagy*. [S.l.]: Taylor and Francis Inc. , 2005

RUSNAK, Frank; MERTZ, Pamela. Calcineurin : Form and Function. v. 80, n. 4, p. 1483–1521, 2000.

RUSSO, Isabella *et al.* 3,6'-Dithiothalidomide, a new TNF- $\alpha$  synthesis inhibitor, attenuates the effect of A $\beta$ 1-42 intracerebroventricular injection on hippocampal neurogenesis and memory deficit. *Journal of Neurochemistry*, v. 122, n. 6, p. 1181–1192, set. 2012.

RYU, Jae K.; MCLARNON, James G. Thalidomide inhibition of perturbed vasculature and glial-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  in an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Disease*, v. 29, n. 2, p. 254–266, 2008.

RYU, Seung Ho *et al.* Incidence and course of depression in patients with Alzheimer's disease. *Psychiatry Investigation*, v. 14, n. 3, p. 271–280, 2017.

SACHSER, Ricardo Marcelo *et al.* Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, and calcineurin. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–9, 7 mar. 2016.

SAUNDERS, A. M. *et al.* Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 with late-onset familial and sporadic alzheimer's disease. *Neurology*, v. 43, n. 8, p. 1467–1472, 1993.

SAVA, Anna *et al.* NMDA-induced ERK signalling is mediated by NR2B subunit in rat cortical neurons and switches from positive to negative depending on stage of development. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 2, p. 925–932, 1 fev. 2012.

SCHEFF, Stephen W. *et al.* Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, v. 27, n. 10, p. 1372–1384, 1 out. 2006.

SCHEFFEL, Jörg *et al.* Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. *Glia*, v. 60, n. 12, p. 1930–1943, 2012.

SCHMUED, Larry C *et al.* Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain research*, v. 1035, n. 1, p. 24–31, 21 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713273>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

SEIBENHENER, Michael L.; WOOTEN, Michael C. Use of the open field maze to measure

locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, n. 96, p. 52434, 6 fev. 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4354627/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354627/?report=abstract)>. Acesso em: 1 jul. 2020.

SELKOE, Dennis J. *Alzheimer's disease is a synaptic failure*. *Science*. [S.l.]: Science. , 25 out. 2002

SELKOE, Dennis J; HARDY, John. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, v. 8, n. 6, p. 595–608, 2016. Disponível em: <<http://embomolmed.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emmm.201606210>>.

SELZNICK, Lee A. *et al.* In situ immunodetection of neuronal caspase-3 activation in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 58, n. 9, p. 1020–1026, 1999.

SEVIGNY, Jeff *et al.* The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, v. 537, n. 7618, p. 50–56, 31 ago. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature19323>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

SHAD, Kaneez Fatima *et al.* Peripheral markers of Alzheimer's disease: surveillance of white blood cells. *Synapse (New York, N. Y.)*, v. 67, n. 8, p. 541–3, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23404438>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

SHAW, K T *et al.* Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, n. 24, p. 11205–11209, 1995. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7479966%5Chttp://www.pnas.org/content/92/24/11205.full.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7479966%5Chttp://www.pnas.org/content/92/24/11205.full.pdf)>.

SHEA, Yat Fung *et al.* *A systematic review of familial Alzheimer's disease: Differences in presentation of clinical features among three mutated genes and potential ethnic differences*. *Journal of the Formosan Medical Association*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 fev. 2016

SHERRINGTON, R. *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, v. 375, n. 6534, p. 754–760, 1995.

SHERRINGTON, R *et al.* *Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant*. *Human Molecular Genetics*. [S.l.: s.n.], 1996.

SHI, Jian-Quan *et al.* Anti-TNF- $\alpha$  reduces amyloid plaques and tau phosphorylation and induces CD11c-positive dendritic-like cell in the APP/PS1 transgenic mouse brains. *Brain research*, v. 1368, p. 239–47, 12 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971085>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

SHIN, Min Ho *et al.* Once-daily, prolonged-release tacrolimus vs twice-daily, immediate-release tacrolimus in de novo living-donor liver transplantation: A Phase 4, randomized, open-label, comparative, single-center study. *Clinical Transplantation*, v. 32, n. 9, 1 set. 2018.

SIEMERS, Eric R. *et al.* Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's & Dementia*, v. 12, n. 2, p. 110–120, 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.jalz.2015.06.1893>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

SIMAN, Robert; COCCA, Ryan; DONG, Yina. The mTOR inhibitor rapamycin mitigates perforant pathway neurodegeneration and synapse loss in a mouse model of early-stage Alzheimer-type tauopathy. *PLoS ONE*, v. 10, n. 11, p. 1–21, 2015.

SOMMERLAD, Andrew *et al.* Association of social contact with dementia and cognition: 28-year follow-up of the Whitehall II cohort study. *PLOS Medicine*, v. 16, n. 8, p. e1002862, 2 ago. 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002862>>. Acesso em:

30 maio 2020.

SON, Jin H *et al.* Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Experimental & molecular medicine*, v. 44, n. 2, p. 89–98, 29 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257884>>. Acesso em: 26 maio 2020.

SON, Sung Min *et al.* A $\beta$ -induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKK $\beta$ -AMPK signaling. *Neurobiology of Aging*, v. 33, n. 5, p. 1006.e11-1006.e23, 2012.

SONG, Xiaowei; MITNITSKI, Arnold; ROCKWOOD, Kenneth. Age-related deficit accumulation and the risk of late-life dementia. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 6, n. 5–8, p. 1–13, 2014.

SORIANO, Francesc X. *et al.* Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 17, p. 4509–4518, 2006.

SPILMAN, Patricia *et al.* Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid- $\beta$  levels in a mouse model of alzheimer's disease. *PLoS ONE*, v. 5, n. 4, p. 1–8, 2010.

ST. GEORGE-HYSLOP, Peter H. *et al.* The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*, v. 235, n. 4791, p. 885–890, 1987.

STANFORD, S. Clare. The Open Field Test: reinventing the wheel. *Journal of Psychopharmacology*, v. 21, n. 2, p. 134–135, 16 mar. 2007. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0269881107073199>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

STEMMER, P. M.; KLEE, C. B. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry*, v. 33, n. 22, p. 6859–6866, 1994.

STREIT, Wolfgang J. *et al.* Microglial pathology. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2014.

STREIT, Wolfgang J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, v. 40, n. 2, p. 133–9, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379901>>. Acesso em: 22 nov. 2013.

SU, Joseph H. *et al.* Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: Correlation with Alzheimer pathology. *Brain Research*, v. 898, n. 2, p. 350–357, 20 abr. 2001.

SUBRAMANIAM, Srinivasa; UNSICKER, Klaus. *ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death*. *FEBS Journal*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd. , 1 jan. 2010

SUN, Jing; NAN, Guangxian. *The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review)*. *International Journal of Molecular Medicine*. [S.l.]: Spandidos Publications. , 1 jun. 2017

SUN, Miao; ASGHAR, Suwaiba Z.; ZHANG, Huaye. The polarity protein Par3 regulates APP trafficking and processing through the endocytic adaptor protein Numb. *Neurobiology of Disease*, v. 93, p. 1–11, 1 set. 2016.

SUN, Xiaojuan; CHEN, Wei Dong; WANG, Yan Dong.  *$\beta$ -Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Frontiers in Pharmacology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 30 set. 2015

SUN, Xu Ying *et al.* Extrasynaptic NMDA receptor-induced tau overexpression mediates neuronal death through suppressing survival signaling ERK phosphorylation. *Cell Death and Disease*, v. 7, n. 11, p. e2449-11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.329>>.

SWIATKOWSKI, Przemyslaw *et al.* Role of Akt-independent mTORC1 and GSK3 $\beta$  signaling in sublethal NMDA-induced injury and the recovery of neuronal electrophysiology and survival. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

SZALAY, Gergely *et al.* Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 maio 2016.

TAGLIALATELA, Giulio. AMYLOID BETA OLIGOMERS IMPAIR FEAR CONDITIONED MEMORY IN A CALCINEURIN-DEPENDENT FASHION IN MICE. v. 88, n. 13, p. 2923–2932, 2011.

TAGLIALATELA, Giulio *et al.* Intermediate- and Long-Term Recognition Memory Deficits in Tg2576 Mice Are Reversed with Acute Calcineurin Inhibition. *Behav Brain Res.*, v. 200, n. 1, p. 95–99, 2010.

TAGLIALATELA, Giulio; RASTELLINI, Cristiana; CICALESE, Luca. Reduced Incidence of Dementia in Solid Organ Transplant Patients Treated with Calcineurin Inhibitors. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, v. 47, n. 2, p. 329–33, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401556>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

TAKASUGI, Nobumasa *et al.* FTY720/Fingolimod, a Sphingosine Analogue, Reduces Amyloid- $\beta$  Production in Neurons. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. 1–8, 2013.

TAKUMA, Hiroshi *et al.* Amyloid Beta Peptide-Induced Cerebral Neuronal Loss Is Mediated by Caspase-3 in Vivo. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 63, n. 3, p. 255–261, 2004.

TAN, Lan. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, v. 41, n. 2, p. 615–631, 2014.

TAYLOR, Anna L; WATSON, Christopher J E; BRADLEY, J Andrew. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical reviews in oncology/hematology*, v. 56, n. 1, p. 23–46, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16039869>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

TELEGINA, Darya V. *et al.* Mechanisms of Neuronal Death in the Cerebral Cortex during Aging and Development of Alzheimer's Disease-Like Pathology in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 22, p. 5632, 11 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5632>>. Acesso em: 26 maio 2020.

TELES-GRILLO RUIVO, Leonor M; MELLOR, Jack R. Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Frontiers in synaptic neuroscience*, v. 5, p. 2, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

TELL, Volkmar; HILGEROTH, Andreas. Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 7, p. 189, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3832900&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 dez. 2015.

TEXIDÓ, Laura *et al.* Amyloid  $\beta$  peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium*, v. 49, n. 3, p. 184–190, 1 mar. 2011.

TOBINICK, Edward L; GROSS, Hyman. Rapid cognitive improvement in Alzheimer's disease following perispinal etanercept administration. *Journal of neuroinflammation*, v. 5, p. 2, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2211476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

rtype=abstract>. Acesso em: 25 fev. 2016.

TRAN, Manh Hung; YAMADA, Kiyofumi; NABESHIMA, Toshitaka. Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview. *Peptides*, v. 23, n. 7, p. 1271–83, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12128084>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

TREMBLAY, Marie-Ève. The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies. *Neuron Glia Biology*, v. 7, n. 01, p. 67–76, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418067>>. Acesso em: 27 nov. 2013.

TREMBLAY, Marie-Ève *et al.* The role of microglia in the healthy brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 31, n. 45, p. 16064–9, 9 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072657>>. Acesso em: 7 nov. 2013.

TREMBLAY, Marie-Ève; LOWERY, Rebecca L; MAJEWSKA, Ania K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology*, v. 8, n. 11, p. e1000527, 11 jan. 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000527>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

TSOI, Kelvin K.F. *et al.* Combination Therapy Showed Limited Superiority Over Monotherapy for Alzheimer Disease: A Meta-analysis of 14 Randomized Trials. *Journal of the American Medical Directors Association*, v. 17, n. 9, p. 863.e1-863.e8, 1 set. 2016.

TU, Shichun *et al.* Oligomeric A $\beta$  -induced synaptic dysfunction in Alzheimer ' s disease. p. 1–12, 2014.

TURRIN, Nicolas P.; RIVEST, Serge. Tumor necrosis factor  $\alpha$  but not interleukin 1 $\beta$  mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 1, p. 143–151, 4 jan. 2006.

TURUNC, Volkan *et al.* Once- vs Twice-Daily Tacrolimus: Survival Rates and Side Effects: Single-Center Experience. *Transplantation Proceedings*, v. 51, n. 7, p. 2308–2311, 1 set. 2019.

TWEEDIE, David *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, v. 9, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <???.>.

UDDIN, Md Sahab *et al.* *Autophagy and Alzheimer's disease: From molecular mechanisms to therapeutic implications*. *Frontiers in Aging Neuroscience*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 30 jan. 2018

VAN BROECKHOVEN, Christine *et al.* Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. *Nature Genetics*, v. 2, n. 4, p. 335–339, 1992.

VAN CAUWENBERGHE, Caroline; VAN BROECKHOVEN, Christine; SLEEGERS, Kristel. *The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives*. *Genetics in Medicine*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 maio 2016

VAN GIAU, Vo *et al.* APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in asian patients with early-onset alzheimer disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 19, 1 out. 2019.

VAN SKIKE, Candice E. *et al.* Inhibition of mTOR protects the blood-brain barrier in models of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 314, n. 4, p. H693–H703, 1 abr. 2018.

VELASCO, Manuel *et al.* Excitotoxicity: An Organized Crime at The Cellular Level. *Journal of Neurology and Neuroscience*, v. 08, n. 03, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://www.jneuro.com/neurology-neuroscience/excitotoxicity-an-organized-crime-at-the-cellular-level.php?aid=19670>>.

VINET, Jonathan *et al.* Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*, v. 9, p. 1–15, 2012.

WALF, Alicia A.; FRYE, Cheryl A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 322–328, mar. 2007.

WALF, Alicia a; FRYE, Cheryl a. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, v. 2, n. 2, p. 322–8, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3623971&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 dez. 2013.

WALLEMACQ, Pierre *et al.* Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: Report of the european consensus conference. *Therapeutic Drug Monitoring*. [S.l.]: Ther Drug Monit. , abr. 2009

WANG, Jian-Zhi; GRUNDKE-IQBAL, Inge; IQBAL, Khalid. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *The European journal of neuroscience*, v. 25, n. 1, p. 59–68, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3191918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

WANG, Rui; REDDY, Hemachandra. Role of Glutamate and NMDA in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, v. 57, n. 4, p. 1041–1048, 2017a.

WANG, Rui; REDDY, P. Hemachandra. *Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease*. *Journal of Alzheimer's Disease*. [S.l.]: IOS Press. , 2017b

WANG, Wen Ying *et al.* Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*. [S.l.]: AME Publishing Company. , 1 jun. 2015

WANG, Yan; QIN, Zheng Hong. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*, v. 15, n. 11, p. 1382–1402, 2010.

WANG, Zhi Cong; ZHAO, Jie; LI, Shao. Dysregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors induced by amyloid- $\beta$ . *Neuroscience Bulletin*, v. 29, n. 6, p. 752–760, 2013.

WEBSTER, Scott J.; BACHSTETTER, Adam D.; VAN ELDIK, Linda J. Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 5, n. 3, p. 1–15, 24 maio 2013.

WEINHARD, Laetitia *et al.* Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>>.

WEISS, Elisabeth M. *et al.* Impairment in emotion recognition abilities in patients with mild cognitive impairment, early and moderate alzheimer disease compared with healthy comparison subjects. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 16, n. 12, p. 974–980, 2008.

WHITMER, R. A. *et al.* Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology*, v. 64, n. 2, p. 277–281, 25 jan. 2005.

WINTER, Aimee N.; BICKFORD, Paula C. *Anthocyanins and their metabolites as therapeutic*




- agents for neurodegenerative disease. *Antioxidants*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 set. 2019
- WOLF, Susanne A.; BODDEKE, H.W.G.M.; KETTENMANN, Helmut. Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, v. 79, n. 1, p. 619–643, 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>>.
- WOODS, Neha Kabra; PADMANABHAN, Jaya. Neuronal calcium signaling and Alzheimer's disease. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 740, p. 1193–217, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22453989>>. Acesso em: 22 fev. 2016.
- WYSS-CORAY, Tony; MUCKE, Lennart. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*, v. 35, n. 3, p. 419–32, 1 ago. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165466>>. Acesso em: 23 fev. 2016.
- XU, Yuan-Zhong *et al.* Regulation of cytokine signaling and T-cell recruitment in the aging mouse brain in response to central inflammatory challenge. *Brain, behavior, and immunity*, v. 24, n. 1, p. 138–52, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19765643>>. Acesso em: 24 dez. 2013.
- YAN, Shijiao *et al.* Association between sedentary behavior and the risk of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Translational Psychiatry*, v. 10, n. 112, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41398-020-0799-5>>.
- YANG, Wenzhong; ZHOU, Xueyan; MA, Tao. Memory Decline and Behavioral Inflexibility in Aged Mice Are Correlated With Dysregulation of Protein Synthesis Capacity. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 11, p. 246, 4 set. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2019.00246/full>>. Acesso em: 1 jun. 2020.
- YASUTAKE, Chie *et al.* Serum BDNF, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in dementia patients: Comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 256, n. 7, p. 402–406, 2006.
- YOKOGAWA, Koichi *et al.* P-glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: Studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharmaceutical Research*. [S.l.: s.n.]. , 1999
- ZÁDORI, Dénes *et al.* Alzheimer's Disease: Recent Concepts on the Relation of Mitochondrial Disturbances, Excitotoxicity, Neuroinflammation, and Kynurenines. *Journal of Alzheimer's Disease*. [S.l.]: IOS Press. , 1 jan. 2018
- ZENARO, Elena *et al.* Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nature medicine*, v. 21, n. 8, p. 880–6, ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.3913>>. Acesso em: 24 nov. 2015.
- ZHAN, Yang *et al.* Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, v. 17, n. 3, p. 400–406, mar. 2014.
- ZHANG, Y-L *et al.* Anxiety-like Behavior and Dysregulation of miR-34a in Triple Transgenic Mice of Alzheimer's Disease - PubMed. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27424985/>>. Acesso em: 1 jun. 2020.
- ZHOU, Li-Jun *et al.* Microglia Are Indispensable for Synaptic Plasticity in the Spinal Dorsal Horn and Chronic Pain. *Cell Reports*, v. 27, p. 3844–3859, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.087>>.
- ZHOU, Qiang; SHENG, Morgan. *NMDA receptors in nervous system diseases*. *Neuropharmacology*. [S.l.]: Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23583930/>>. Acesso em: 3 jul. 2020. , 2013



## 8. ANEXOS

Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 200/2017.



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA: 200/2017**

**Título do projeto:** Avaliação dos efeitos de imunossuppressores inibidores da calcineurina em um modelo animal de Doença de Alzheimer

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira

**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas

**Departamento:** Departamento de Farmacologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 28/08/2017. Validade: 28/08/2017 à 27/08/2022

Belo Horizonte, 28/08/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@ppq.ufmg.br](mailto:cetea@ppq.ufmg.br)

Anexo B: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 248/2019.

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
<b>Prezado(a):</b>	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite <b>CEUA</b> que indica mudança na situação de uma solicitação.	
<b>Protocolo CEUA:</b> 248/2019 <b>Título do projeto:</b> Avaliação dos efeitos da inibição da calcineurina no modelo de excitotoxicidade induzido pela injeção intrahipocampal de NMDA <b>Finalidade:</b> Pesquisa <b>Pesquisador responsável:</b> Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira <b>Unidade:</b> Instituto de Ciências Biológicas <b>Departamento:</b> Departamento de Farmacologia	
<b>Situação atual:</b> <b>Decisão Final - Aprovado</b>	
Aprovado na reunião do dia 30/09/2019. Validade: 30/09/2019 à 29/09/2024	
Belo Horizonte, 30/09/2019.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite <b>CEUA</b> UFMG <a href="https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/">https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</a>	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a>	

Anexo C: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Freiburg (Alemanha), protocolo 248/ X-19/06R.



UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG - Dr. H. Runck -  
CEMT –FR - Stefan-Meier-Str. 8, 79104 Freiburg

Dr. Bernd Fiebich  
University Hospital Freiburg  
Department of Psychiatry and Psychotherapy  
Laboratory of Translational Psychiatrie  
Hauptstr. 5  
79104 Freiburg

Center for Experimental Models  
and Transgenic Services –  
Freiburg (CEMT-FR)

**Dr. med. vet. Hanna Runck**  
Tierschutzbeauftragte

Stefan-Meier-Str. 8  
79104 Freiburg

Tel.: 0761/203-7758

[hanna.runck@uniklinik-freiburg.de](mailto:hanna.runck@uniklinik-freiburg.de)

**Aktenzeichen** X-19/06R

Freiburg, 09. Oktober 2019

### **Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken**

gemäß §1, §4 Abs. 3 TierSchG v. 4.7.2013  
und TierSchVersV v. 12.8.2013, §2, Anlage 1, Anlage 2

#### **Ihre Anmeldung vom 08.10.2019**

Sehr geehrter Herr Dr. Fiebich,

hiermit bestätige ich den Eingang Ihrer Anmeldung „Neuroinflammation und epigenetische Veränderungen bei psychischen sowie neurodegenerativen Erkrankungen (Fortsetzung Antrag X-13/06a)“.

Ich bestätige die Tötung von 7250 Mäusen und 1000 Ratten der in der Anzeige genannten Linien im Zeitraum vom 01.01.2020 bis 31.12.2024.

Das Aktenzeichen der Anmeldung lautet **X-19/06R**.

Folgende Personen dürfen die Tötung durchführen:

Dr. Magdalena Weidner

Sr. Soraya Wilke Saliba

Frau Ulrike Götzingen Berger

Anexo D: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação por meio da tarefa de reconhecimento de objeto novo no modelo de microinjeção de NMDA, encontrada na figura 11.

<b>Grupo</b>	<b>t, df</b>	<b>p</b>
Veículo + Salina	t = 8,214, df = 6	0,0002
Veículo + NMDA	t = 0,4500, df = 6	0,6685
FK 2,5 + Salina	t = 5,383, df = 5	0,0030
FK 2,5 + NMDA	t = 0,6526, df = 5	0,5428
FK 5 + Salina	t = 2,719, df = 5	0,0418
FK 5 + NMDA	t = 3,266, df = 6	0,0171
FK 10 + Salina	t = 3,280, df = 5	0,0220
FK 10 + NMDA	t = 0,2069, df = 7	0,8420

Média teórica = 0,5; df – grau de liberdade.

Anexo E: Análise estatística obtida a partir da avaliação por WB dos níveis de fosforilação de Akt e Erk 30 minutos ou 24 horas após a microinjeção de NMDA ou salina, encontrada na figura 15.

<b>Experimento</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Akt 30 minutos	F (3, 16) = 1,425	0,2723
Akt 24 horas	F (3, 14) = 6,061	0,0073
Erk 30 minutos	F (3, 13) = 0,710	0,5628
Erk 24 horas	F (3, 14) = 5,637	0,0095

Anexo F: Análise estatística obtida a partir da avaliação da expressão gênica em culturas organotípicas de fatias de hipocampo, encontradas nas figuras 17, 18 e 22.

<b>Expressão</b>	<b>Kruskal-Wallis</b>	<b>p</b>
NeuN	9,716	0,0179
Iba-1	5,866	0,2154
GFAP	9,269	0,0261
TNF- $\alpha$	10,44	0,0337
BDNF	2,224	0,7388
NGF	8,586	0,0723
TGF $\beta$	10,06	0,0395

Bcl-2	6,309	0,1772
Bad	3,179	0,5749
SOD1	2,276	0,6851
SOD2	1,628	0,8038

Anexo G: Análise estatística obtida a partir da avaliação da expressão gênica em culturas organotípicas de fatias de hipocampo depletadas, encontradas nas figuras 19, 20 e 22.

<b>Expressão</b>	<b>Kruskal-Wallis</b>	<b>p</b>
NeuN	5,540	0,2505
GFAP	4,734	0,3475
BDNF	6,110	0,1923
NGF	1,880	0,7983
TGF $\beta$	7,789	0,0738
Bcl-2	7,252	0,1036
Bad	7,151	0,1105
SOD1	1,209	0,9055
SOD2	4,465	0,3843

Anexo H: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação por meio da tarefa de reconhecimento de objeto novo no modelo de microinjeção de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, encontrada na figura 22.

<b>Grupo</b>	<b>t, df</b>	<b>p</b>
Veículo + Salina	t = 4,028, df = 6	0,0069
Veículo + A $\beta$	t = 1,635, df = 6	0,1532
FK 2,5 + Salina	t = 5,383, df = 5	0,0030
FK 2,5 + A $\beta$	t = 0,8551, df = 6	0,4253
FK 5 + Salina	t = 2,719, df = 5	0,0418
FK 5 + A $\beta$	t = 3,847, df = 7	0,0063
FK 10 + Salina	t = 3,280, df = 5	0,0220
FK 10 + A $\beta$	t = 1,617, df = 7	0,1500

Média teórica = 0,5; df – grau de liberdade.

Anexo I: Análise estatística obtida a partir da avaliação da imunomarcagem por NeuN no modelo de microinjeção de  $A\beta_{1-42}$ , encontrada na figura 23.

Região	Interação	Estímulo	Tratamento
Giro denteado	F (2, 22) = 0,0604 p = 0,9415	F (1, 22) = 1,673 p = 0,2092	F (2, 22) = 0,2671 p = 0,7680
CA1	F (2, 24) = 0,9443 p = 0,4029	F (1, 24) = 3,174 p = 0,0875	F (2, 24) = 0,5275 p = 0,5968

Anexo J: Análise estatística obtida a partir da avaliação por WB dos níveis de fosforilação de Akt e Erk 30 minutos ou 24 horas após a microinjeção de  $A\beta_{1-42}$  ou salina, encontrada na figura 27.

Experimento	F	p
Akt 30 minutos	F (3, 12) = 0,1559	p = 0,9238
Akt 24 horas	F (3, 10) = 0,1784	p = 0,9086
Erk 30 minutos	F (3, 12) = 0,1450	p = 0,9309
Erk 24 horas	F (3, 12) = 0,9862	p = 0,4319

Anexo K: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação por meio da tarefa de reconhecimento de objeto novo no modelo transgênico APP/PS1, encontrada na figura 30.

Grupo	t, df	p
WT + Veículo	t = 3,379, df = 6	0,0149
TG + Veículo	t = 1,120, df = 7	0,2997
WT + FK506	t = 0,3494, df = 5	0,7410
TG + FK506	t = 0,3775, df = 5	0,7213

Média teórica = 0,5; df – grau de liberdade.

Anexo L: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação por meio do teste de interação social no modelo transgênico APP/PS1, encontrada na figura 30.

Grupo	t, df	p
WT + Veículo	t = 3,012, df = 7	0,0196
TG + Veículo	t = 1.817, df = 5	0,1289
WT + FK506	t = 4,925, df = 7	0,0017
TG + FK506	t = 3.101, df = 7	0,0173

Média teórica = 0,5; df – grau de liberdade.



Anexo J: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação por meio do teste de memória social no modelo transgênico APP/PS1, encontrada na figura 30.

<b>Grupo</b>	<b>t, df</b>	<b>p</b>
WT + Veículo	t = 1,756, df = 6	0,1297
TG + Veículo	t = 1,097, df = 8	0,3046
WT + FK506	t = 0,5445, df = 7	0,6030
TG + FK506	t = 0,7077, df = 5	0,5107

Média teórica = 0,5; df – grau de liberdade.

Anexo M: Análise estatística obtida a partir da avaliação da imunomarcação por NeuN no modelo transgênico APP/PS1, encontrada na figura 32.

<b>Região</b>	<b>Interação</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Tratamento</b>
Giro denteado	F (1, 16) = 0,007 p = 0,9310	F (1, 16) = 0,7287 p = 0,4059	F (1, 16) = 0,6103 p = 0,4461
CA1	F (1, 16) = 0,001 p = 0,9695	F (1, 16) = 0,006 p = 0,9355	F (1, 16) = 0,2146 p = 0,6494

Anexo N: Análise estatística obtida a partir da avaliação dos níveis de fatores neurotróficos no hipocampo e no córtex pré-frontal no modelo transgênico APP/PS1, encontrada na figura 34.

<b>Região</b>	<b>Interação</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Tratamento</b>
BDNF Hipocampo	F (1, 22) = 4,117 p = 0,0547	F (1, 22) = 48,68 p < 0,0001	F (1, 22) = 9,79 p = 0,0049
GDNF Hipocampo	F (1, 23) = 2,125 p = 0,1584	F (1, 23) = 0,8394 p = 0,3691	F (1, 23) = 0,4645 p = 0,5023
NGF Hipocampo	F (1, 25) = 3,908 p = 0,0592	F (1, 25) = 0,4455 p = 0,5106	F (1, 25) = 0,033 p = 0,8563
BDNF córtex	F (1, 24) = 0,089 p = 0,7670	F (1, 24) = 1,056 p = 0,3143	F (1, 24) = 5,254 p = 0,031
GDNF córtex	F (1, 24) = 0,5335 p = 0,4722	F (1, 24) = 0,071 p = 0,7914	F (1, 24) = 3,118 p = 0,0868
NGF córtex	F (1, 24) = 0,018 p = 0,8929	F (1, 24) = 0,024 p = 0,8778	F (1, 24) = 1,57 p = 0,2223

Anexo O: Análise estatística obtida a partir da avaliação dos níveis de citocina no hipocampo e no córtex pré-frontal no modelo transgênico APP/PS1, encontrada na figura 35.

<b>Região</b>	<b>Interação</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Tratamento</b>
IL-1 $\beta$ Hipocampo	F (1, 23) = 2,031 p = 0,1676	F (1, 23) = 0,073 p = 0,7890	F (1, 23) = 0,9080 p = 0,3506
Il-6 Hipocampo	F (1, 22) = 1,039 p = 0,3192	F (1, 22) = 4,547 p = 0,044	F (1, 22) = 1,498 p = 0,2354
IL-10 Hipocampo	F (1, 23) = 0,4641 p = 0,5026	F (1, 23) = 0,085 p = 0,7726	F (1, 23) = 0,4855 p = 0,4929
TNF- $\alpha$ Hipocampo	F (1, 22) = 1,080 p = 0,31	F (1, 22) = 0,054 p = 0,8174	F (1, 22) = 2,354 p = 0,1392
CX3CL1 Hipocampo	F (1, 23) = 0,0005 p = 0,9941	F (1, 23) = 1,71 p = 0,2040	F (1, 23) = 0,002 p = 0,9645
IL-1 $\beta$ Córtex	F (1, 24) = 0,3619 p = 0,531	F (1, 24) = 0,470 p = 0,4994	F (1, 24) = 0,020 p = 0,8877
Il-6 Córtex	F (1, 24) = 0,3321 p = 0,5698	F (1, 24) = 0,969 p = 0,3346	F (1, 24) = 0,011 p = 0,9142
IL-10 Córtex	F (1, 23) = 0,178 p = 0,6764	F (1, 23) = 0,242 p = 0,627	F (1, 23) = 0,3837 p = 0,5417
TNF- $\alpha$ Córtex	F (1, 22) = 0,8203 p = 0,3749	F (1, 22) = 0,316 p = 0,5794	F (1, 22) = 0,5158 p = 0,4802
CX3CL1 Córtex	F (1, 22) = 0,016 p = 0,90	F (1, 22) = 0,043 p = 0,836	F (1, 22) = 7,40 p = 0,012