

**Tese de Doutorado**

**EFEITO PROTETOR DA MINOCICLINA CONTRA DANOS DE  
MEMÓRIA E NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL  
DE DEMÊNCIA DO TIPO ALZHEIMER INDUZIDO PELA  
ADMINISTRAÇÃO DE  $\beta A_{1-42}$**

**MICHELLE LIMA GARCEZ**



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MICHELLE LIMA GARCEZ**

**EFEITO PROTETOR DA MINOCICLINA CONTRA DANOS DE  
MEMÓRIA E NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL  
DE DEMÊNCIA DO TIPO ALZHEIMER INDUZIDO PELA  
ADMINISTRAÇÃO DE  $\beta_{A1-42}$**

Tese de Doutorado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade do  
Extremo Sul Catarinense para obtenção  
do título de Doutora em Ciências da  
Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Josiane Budni.

Criciúma  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G215e Garcez, Michelle Lima.

Efeito protetor da Minociclina contra danos de memória e neuroinflamação de modelo animal de demência do tipo Alzheimer induzido pela administração de  $\beta A_{1-42}$  / Michelle Lima Garcez. – 2017.

123 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

Orientação: Josiane Budni.

1. Minociclina – Uso terapêutico. 2. Alzheimer, Doença de – Tratamento. 3. Neuroinflamação. I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 615.1

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364

Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE -- UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

---

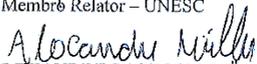
## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Michelle Lima Garcez** sob o título “EFEITO PROTETOR DA MINOCICLINA CONTRA DANOS DE MEMÓRIA E NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA DO TIPO ALZHEIMER INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE  $\beta A_{1-42}$ ”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

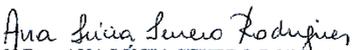
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

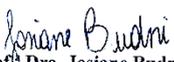
Criciúma, SC, 23 de junho de 2017.

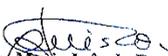
  
Prof.<sup>a</sup> Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI  
Membro Relator – UNESC

  
Prof. Dr. ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER  
Membro Interno – UNESC

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. PATRÍCIA DE SOUZA BROCARDI  
Membro Externo – UFSC

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. ANA LÚCIA SEVERO RODRIGUES  
Membro Externo – UFSC

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Jostiane Budni  
Orientadora

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Inês da Rosa  
Coordenadora do PPGCS



A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



Dedico essa tese aos meus pais, minha mãe Maria Clair Lima Garcez, e em especial, meu pai Hilton Luiz Ache Garcez (*in memoriam*), pela vida, pelo amor incondicional e pelo incentivo para almejar e sonhar sempre mais alto.



## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer inicialmente minha família. Minha mãe, Maria Clair que sempre me incentivou a estudar e nunca gostou de me dar respostas prontas, sempre me incentivando a ir atrás das respostas e além. Meu pai Hilton Luiz, que tenho certeza que de onde está, está muito orgulhoso dessa minha conquista. Meu irmão, também, Hilton Luiz, que sempre me mostrou a importância de estudar.

Agradeço muito meu marido, Vinícius Behm, você me mostra cada dia o real significado do amor, o amor altruísta, sem cobranças, que compreende, respeita, incentiva e faz crescer. Obrigada meu amor, por sempre me apoiar nas decisões e sonhar comigo, além de claro, por vezes atrapalhar meu trabalho, me obrigando a parar de trabalhar para fazer qualquer outra coisa, como ir para praia ou simplesmente olhar um vídeo de surfe, agradeço principalmente por isso!

Outras pessoas as quais sem elas eu não teria conseguido concluir esse trabalho, são minhas amigas e amigos, que agradeço imensamente pelo apoio, já que tenho absoluta necessidade deles. Tanto aqueles que não sabem o quanto são meus amigos, mas pela mera condição de existirem, me encorajam a seguir em frente pela vida, e principalmente, aos que sabem a importância que tem na minha vida e tem absoluta certeza de estarem incluídos nesta lista, mesmo sem eu citar nomes.

Obrigada ao pessoal do Laboratório de Neurociências, que além de amigos, foram meus parceiros e colaboradores nessa jornada. Em especial minha dupla inseparável, Tati e Fran, que compõe nosso trio “especial” e o pessoal da iniciação científica, que não pouparam esforços para realizar esse trabalho, Aline, Skiva, Hemily, Ari, Fran, Jú, Nati, Gabi, Duda, Matheus, Maylton, Renan, Lucas, Júlia e outros, meu muito obrigada!

E claro, minha orientadora, Josi, agradeço demais pela orientação, pela amizade, pelo apoio, confiança e autonomia que você me deu desde o início da nossa parceria, que foi a escolha mais acertada que fiz para o doutorado. Que possamos realizar ainda muitos projetos juntas.

Agradeço também ao professor Ricardo Pinho, por ter disponibilizado o uso do micrótomo nas dependências do Laboratório de Fisiologia do exercício e ao Laboratório Multiusuários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pelo uso do microscópio. Meu agradecimento se estende também a FAPESC e CAPES pelo apoio financeiro.



*“Por mais que os cientistas tentem responder a todas as perguntas e desvendar todos os mistérios da vida, nunca teremos todas as respostas. Não por falta de dúvidas, de anseio ou de persistência, mas talvez porque para nem todos os questionamentos existam respostas.”*

*(Própria autora)*



## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva de memória, acúmulo de peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A), principalmente o  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, emaranhados de proteínas tau hiperfosforiladas, e mais recentemente, neuroinflamação. Ainda não há tratamento para curar ou evitar a progressão da DA, nem algum medicamento aprovado para atuar na neuroinflamação. Assim, o presente estudo avaliou o efeito do cloridrato de minociclina, um antibiótico com ação anti-inflamatória e neuroprotetora, na memória e neuroinflamação em um modelo de demência do tipo DA. Foram utilizados camundongos Balb/c (100 dias). Os animais foram submetidos a administração de oligômeros  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (400pmol) no ventrículo cerebral esquerdo. Decorridas 24 horas da administração dos oligômeros  $\beta$ A<sub>1-42</sub> foi iniciado o tratamento via oral com cloridrato de minociclina (50 mg/kg) durante 17 dias. Foi avaliada a locomoção pelo teste de campo aberto, a memória espacial pelos testes de labirinto octogonal e labirinto em Y e a memória aversiva dos animais pelo teste de esquiva inibitória, e no 18º dia, 24 horas após a última administração de minociclina, os animais foram mortos para a dissecação do córtex total, hipocampo e coleta de soro para análises de western blot e imunoenensaio enzimático. Um grupo independente de animais foi submetido à perfusão transcardíaca com paraformaldeído e o encéfalo foi removido para análises de imuno-histoquímica e histologia. O tratamento com minociclina melhorou a memória espacial e aversiva dos camundongos submetidos ao modelo de demência. Além disso, a minociclina reverteu o aumento dos níveis de interleucina (IL)-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 causado pela administração dos oligômeros  $\beta$ A<sub>1-42</sub> no hipocampo. No córtex total a minociclina reverteu o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 nos animais submetidos ao modelo de demência do tipo DA. No soro, houve um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-4 nos animais que receberam os oligômeros  $\beta$ A<sub>1-42</sub> e a minociclina reverteu este efeito. A minociclina também reverteu o aumento dos níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo e de fator de crescimento neural (NGF) no córtex total dos animais submetidos ao modelo. No hipocampo, a minociclina também reduziu os níveis de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> e a ativação microglial nos animais que receberam os oligômeros  $\beta$ A<sub>1-42</sub>. Essa redução da ativação microglial ocorreu provavelmente pela redução de receptores *toll-like 2*, sua proteína adaptadora MyD88 e redução do inflamassoma NLRP3, avaliados por imuno-histoquímica e confirmados por Western blot. Não foi observado efeito da minociclina em prevenir a morte neuronal no hipocampo,

avaliada pela coloração de Nissl, que evidência alterações morfológicas nos neurônios. Os resultados em conjunto indicam que a minociclina foi capaz de melhorar a memória e reduzir a neuroinflamação em camundongos submetidos ao modelo de demência do tipo DA, induzido pela administração de  $\beta A_{1-42}$ . O efeito da minociclina em reduzir a neuroinflamação no hipocampo envolve a inibição de receptores *toll-like* 2 e inibição da ativação do inflamassoma NLRP3. Essa via leva a liberação de IL-1 $\beta$  e possivelmente também de outras citocinas inflamatórias para o meio extracelular. Portanto, a minociclina parece ter efeitos promissores para o tratamento da DA, podendo conter a neuroinflamação e melhorar o dano de memória.

**Palavras-chave:** Minociclina; Doença de Alzheimer; memória; inflamação; NLRP3.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive memory loss,  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) accumulation, mainly  $A\beta_{1-42}$ , hyperphosphorylated tau proteins increased, and recently, neuroinflammation. There is no treatment leads to cure or avoid the progress of the AD, and neither there is a drug approved for neuroinflammation. Thus, the present study evaluated the effect of minocycline chlorhydrate on memory and neuroinflammation in an AD-like dementia mouse model. Balb/c mice (100 days) were subjected to administration of  $A\beta_{1-42}$  oligomers (400pmol) on left cerebral ventricle. 24 hours after  $A\beta_{1-42}$  oligomers administration was started minocycline chlorhydrate (50 mg/kg) treatment by oral route for 17 days. The locomotion of the animals was evaluated on the open field test, the spatial memory was evaluated on the octagonal maze task and Y maze, and the aversive memory was evaluated on the inhibitory avoidance task. On the 18<sup>th</sup> day, 24 hours after the last minocycline administration, the animals were killed for dissection of total cortex and hippocampus, and the serum was collected for western blot and enzyme immunoassay analysis. An independent group of animals was subjected to transcardiac perfusion with paraformaldehyde, and the brain was removed for immunohistochemical and histological analysis. The minocycline treatment improved spatial and aversive memory of the mice subjected to the dementia model. Moreover, minocycline reverted the increase of interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 levels on hippocampus caused by the  $A\beta_{1-42}$  oligomers administration. In the total cortex, minocycline reverted the increase of IL -1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 levels of the animals subjected to the AD-like dementia model. In the serum, there was an increase of the IL-1 $\beta$  and IL-4 levels in the animals received  $A\beta_{1-42}$  oligomers, and minocycline treatment reverted this. Minocycline also reverted the increase of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the hippocampus and reverted the increase of nerve growth factor (NGF) levels in the total cortex subjected to model. In the hippocampus, minocycline reduced  $A\beta_{1-42}$  levels and the microglial activation in the animals that received  $A\beta_{1-42}$  oligomers. This microglial activation reduction occurred by the reduction of toll-like receptors 2 content, and its adapter MyD88 protein, and reduction of the NLRP3 inflammasome evaluated by immunohistochemistry and confirmed by Western blot. There was no effect of minocycline of hippocampal neurons death evaluated by Nissl staining, which indicates morphological alterations in the neurons. Altogether, the results indicated that

minocycline was able to improve memory and reduce neuroinflammation in mice subjected to the AD-like dementia model induced by A $\beta$ <sub>1-42</sub> administration. The minocycline effect on the reduction of neuroinflammation the hippocampus involves toll-like 2 receptors inhibition and NLRP3 inflammasome activation. This pathway leads to a release of IL-1 $\beta$  and possibly other inflammatory cytokines into the extracellular space. Therefore, minocycline has promising effects for AD treatment, which includes neuroinflammation reduction and memory damage improvement.

**Keywords:** Minocycline; Alzheimer's disease; memory; inflammation; NLRP3.

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1:</b> A APP sofre clivagem pelas enzimas $\alpha$ - ou $\beta$ -secretases que iniciam duas vias diferentes, a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica, respectivamente.....	17
<b>Figura 2:</b> Ativação dos receptores toll-like (TLRs).....	20
<b>Figura 3:</b> Local da injeção dos oligômeros $\beta A_{1-42}$ em camundongos Balb/c.....	30
<b>Figura 4:</b> Linha do tempo do protocolo experimental da etapa 1.....	31
<b>Figura 5:</b> Linha do tempo do protocolo experimental da etapa 2.....	32
<b>Figura 6:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg), no teste de labirinto octogonal, em camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	40
<b>Figura 7:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) na locomoção de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA avaliada no teste de campo aberto.....	40
<b>Figura 8:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) no teste de labirinto em Y em camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	41
<b>Figura 9:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) no teste de esquiwa inibitória em camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	42
<b>Figura 10:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de IL-1 $\beta$ em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	43
<b>Figura 11:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de TNF- $\alpha$ em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	44
<b>Figura 12:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de IL-6 em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	45
<b>Figura 13:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de IL-4 em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	46
<b>Figura 14:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de IL-10 em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c	

administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	47
<b>Figura 15:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de BDNF e NGF em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	48
<b>Figura 16:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de $\beta A$ nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	49
<b>Figura 17:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de iba-1 nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	50
<b>Figura 18:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de TLR2 nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	52
<b>Figura 19:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de NLRP3 nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	54
<b>Figura 20:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) na expressão de proteínas no hipocampo de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	56
<b>Figura 21:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) no número de neurônios picnóticos no hipocampo de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	57
<b>Figura 22:</b> Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) no hipocampo de camundongos Balb/c administrados com $\beta A_{1-42}$ i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	58
<b>Figura 23:</b> Mecanismos de ação da minociclina encontrados no presente estudo.....	74

## Lista de abreviaturas

- ACSF - Líquido cefalorraquidiano artificial (do inglês, *artificial cerebrospinal fluid*)
- AINEs - Anti-inflamatórios não esteróides
- ANOVA - Análise de variância (do inglês, *analysis of variance*)
- ANVISA - Agência nacional da vigilância sanitária
- APAF-1 - Protease associada à apoptose 1 (do inglês, *apoptotic protease activating factor 1*)
- ApoE - Apolipoproteína E
- APP - Proteína precursora amiloide (do inglês, *amyloid precursor protein*)
- BDNF - Fator Neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*)
- CA1 - Região CA1 do Hipocampo (do inglês, *hippocampal CA1 region*)
- CA3 - Região CA3 do Hipocampo (do inglês, *hippocampal CA2 region*)
- CCL11 – Motivo CC de quimiocina 11– (do inglês, *C-C motif chemokine 11*)
- CONCEA - Conselho nacional de controle de experimentação animal
- DA - Doença de Alzheimer
- ECD - Escore clínico de demência
- ERO - Espécies reativas de oxigênio
- FDA - *Food and Drug Administration*
- GD - Giro denteado
- HE – Hematoxilina-eosina
- IL-10 - Interleucina 10
- IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$
- IL-4 - Interleucina 4
- IL-6 - Interleucina 6
- iNOS - óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *nitric oxide synthase*)
- LCR - Líquido cefalorraquidiano
- LPS - Lipopolissacarídeo
- LTP - Potencial de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*)
- MMP-9 - metaloproteinases da matriz-9
- MYD88 - Fator de diferenciação mieloide 88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response gene 88*)
- NF-kB - Fator nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa B*)
- NFT - Emaranhados neurofibrilares (do inglês, *neurofibrillary tangles*)
- NGF – Fator de crescimento neural (do inglês, *nerve growth factor*)
- NLRP3 - do inglês, *oligomerization domain-like receptor family pyrine domain-containing 3*

NMDA - N-Metil-D-Aspartato

p38 MAPK - proteína cinase ativada por mitógeno p38 (do inglês, *p38 mitogen-activated protein kinase*)

PAMPs - Padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*)

PRRs - receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *pattern recognition receptors*)

PSEN1 - Presenilina 1

PSEN2 - Presenilina 2

SNC – Sistema nervoso central

Th1 – Células auxiliares T do tipo 1 (do inglês, *type T helper 1*)

Th2 – Células auxiliares T do tipo 2 (do inglês, *type T helper 2*)

TLR2 – receptores toll-like 2 (do inglês, *toll-like receptor 2*)

TLR4 – receptores toll-like 4 (do inglês, *toll-like receptor 4*)

TLR6 – receptores toll-like 6 (do inglês, *toll-like receptor 6*)

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (do inglês, *tumor necrosis factor- $\alpha$* )

TrkA - receptor tropomiosina quinase A (do inglês, *tropomyosin receptor kinase A*)

TrkB - receptor tropomiosina quinase B (do inglês, *tropomyosin receptor kinase B*)

$\beta$ A - beta-amiloide

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 Doença de Alzheimer.....	25
1.2 Neuroinflamação na DA.....	28
1.3 Fatores neurotróficos na DA.....	32
1.4 Tratamento da DA.....	33
1.5 O cloridrato de minociclina como uma alternativa farmacológica na DA.....	34
1.6 Modelos de DA em roedores.....	36
1.7 Justificativa do estudo.....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
3.1 Animais.....	41
3.2 Indução do modelo animal pela administração de oligômeros $\beta A_1$ .....	41
3.3 Tratamento e desenho experimental.....	42
3.3.1 Etapa 1.....	43
3.3.2 Etapa 2.....	43
3.4 Testes comportamentais.....	44
3.4.1 Labirinto octogonal.....	44
3.4.2 Campo aberto.....	45
3.4.3 Labirinto em Y.....	45
3.4.4 Esquiva inibitória.....	46



3.5 Análises Imunoquímicas .....	46
3.5.1 Imunoensaio enzimático.....	46
3.5.2 Imunodeteção por western blot.....	47
3.5.3 Perfusão transcardíaca e realização dos cortes histológicos.....	48
3.5.4 Imuno-histoquímica .....	48
3.5.5 Histologia .....	49
3.6 Análise estatística.....	50
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO A - Aprovação da comissão de ética no uso de animais.</b>	<b>122</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica, sendo considerada a maior causa de demência em idosos (Pierce et al., 2017). A DA ocasiona danos progressivos nas funções cerebrais, que incluem danos de memória, orientação espacial, linguagem, mudanças de comportamento e de personalidade (Vickers et al., 2016). O sintoma mais prevalente na DA é a perda de memória, e posteriormente nas fases mais graves da doença, ocorrem complicações motoras, deixando os indivíduos portadores da doença completamente acamados e dependentes de cuidadores (Howard et al., 2015; Prischmann, 2016).

Em 2010, estimava-se que cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo estariam afetadas pela DA. A estimativa é que este número aumentará para 60,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050 (Cumming e Brodtmann, 2010). A partir dos 65 anos, a prevalência da DA e marcadores de neurodegeneração dobram a cada cinco anos. Em indivíduos entre 60 e 64 anos a prevalência da DA é de aproximadamente 0,7%, aumentando para 5,6% entre os 70 e 79 anos, podendo chegar a 38,6% em idosos acima de 90 anos (Savva et al., 2009; Jack et al., 2014; Jack et al., 2015; Dubois et al., 2016). Deste modo, o envelhecimento é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA, contribuindo para que a doença constitua um problema de saúde pública de grande impacto social e financeiro nas próximas décadas. Assim, a DA causará, e já está causando, um enorme sofrimento para os indivíduos afetados e suas famílias. Segundo a *Alzheimer's Association* (2015), ocorrerá uma grande sobrecarga nos sistemas de saúde em todo o mundo, uma vez que são esperados que os custos com a doença ultrapassem US\$ 1 trilhão de dólares anuais em 2050.

A etiologia da doença ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que múltiplos fatores ambientais e genéticos estão envolvidos. Nos últimos anos, vários genes foram relacionados ao desenvolvimento e progressão da DA, incluindo o gene da apolipoproteína E (ApoE), mutação na proteína precursora amiloide, do inglês "*amyloid precursor protein*" (APP), e na presenilina 1 (PSEN1) ou na presenilina 2 (PSEN2). Além de polimorfismos em genes envolvidos na imunidade inata (CR1, CD33, MS4A, CLU, ABCA7, EPHA1 e HLA-DRB5-HLA-DRB1), na função microglial (INPP5D), endocitose (PICALM, SORL1) e fagocitose (TREM2), identificados através de estudos da associação

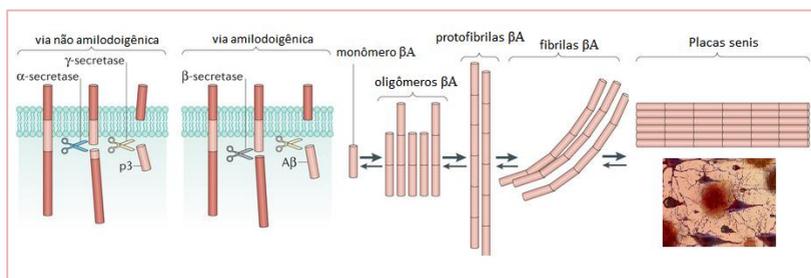
ampla do genoma (Lambert et al., 2013; Ramanan et al., 2015; Ridge et al., 2016). Já os fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento da doença são: aumento da idade, baixo nível de escolaridade, depressão, hipertensão, diabetes, dislipidemias, sedentarismo e baixa atividade cognitiva (Schipper, 2011; Durazzo et al., 2014). As formas genéticas da doença possuem uma etiologia determinada predominantemente por mutações em genes específicos, como da ApoE, APP e PSEN 1 e 2. Já a forma esporádica da DA, que é a mais prevalente da doença, não tem a etiologia totalmente elucidada, sabe-se apenas que envolve polimorfismos em diferentes genes, juntamente com a exposição a fatores ambientais (Lanoiselée et al., 2017).

De acordo com os critérios de diagnóstico a DA pode ser classificada em estágios de gravidade, como estágio leve, moderado e grave. No entanto, a doença progride sempre a níveis graves e em último estágio leva à óbito (De-Paula et al., 2012). O diagnóstico é principalmente clínico, e classifica quanto à gravidade do comprometimento cognitivo. São utilizados principalmente o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) e Escore Clínico de Demência (ECD) os quais avaliam a função cognitiva global, através de uma bateria de testes neuropsicológicos que incluem teste de memória, fluência verbal, habilidades visuoespaciais e escala da vida diária. O diagnóstico da DA é confirmado somente em cérebro *post mortem* (Perneckzy et al., 2006). A DA é extremamente debilitante, sendo associada a intenso sofrimento para o paciente, causando prejuízo funcional progressivo, perda de independência, sofrimento emocional e sintomas comportamentais que podem incluir alucinações (Sadowsky e Galvin, 2012).

Inicialmente, o processo neurodegenerativo observado na DA envolve a perda sináptica e alterações de neurotransmissores, principalmente redução de sinapses colinérgicas (Braak et al., 1993; Auld et al., 2002; Kim et al., 2013). Durante o curso da doença, ocorre a morte de cerca de 80% dos neurônios do hipocampo, relacionada ao prejuízo cognitivo grave (Moller et al., 2013), e em estágios tardios há uma grande perda neuronal com atrofia cerebral evidente e dilatação dos ventrículos (Bell e Claudio Cuello, 2006; Buoso et al., 2010; Citron, 2010; Sery et al., 2013).

As mais conhecidas alterações histopatológicas na DA são: a perda neuronal, o acúmulo extracelular de peptídeo beta-amiloide ( $\beta A_{1-42}$ ) e os emaranhados neurofibrilares, do inglês, *neurofibrillary tangles* (NFTs) (Sery et al., 2013). Os NFTs são compostos de proteína tau hiperfosforilada, que se acumula no meio intracelular e leva a perda da estabilidade e função do citoesqueleto neuronal, já que esta é a proteína

responsável pela manutenção do citoesqueleto (Iqbal et al., 2009; Avila et al., 2010; Hernandez et al., 2013). Já o acúmulo de peptídeo  $\beta A_{1-42}$  forma placas extracelulares denominadas “placas senis”, isto ocorre, devido ao aumento e processamento anormal da APP (Buoso et al., 2010). A APP é uma proteína transmembranar altamente expressa em tecidos neuronais humanos. A APP sofre clivagem pelas enzimas  $\alpha$ - ou  $\beta$ -secretases, que iniciam duas vias diferentes, a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica, respectivamente. Quando APP é clivada pela  $\alpha$ -secretase, forma um fragmento extracelular solúvel, sAPP $\alpha$ , sem toxicidade. Quando APP é clivada por  $\beta$ -secretase, gera um fragmento solúvel extracelular, sAPP $\beta$ , e um fragmento carboxi-terminal CTF99. Este último é ainda clivado pela ação da  $\gamma$ -secretase formando um fragmento  $\beta A$  (Puzzo et al., 2015). O peptídeo  $\beta A$  tende a se agregar formando oligômeros e protofibrilas que posteriormente se agregam dando origem as fibrilas, as quais compõe as placas senis (Lasagna-Reeves et al., 2011; Heppner et al., 2015) (figura 1).



**Figura 1:** A APP sofre clivagem pelas enzimas  $\alpha$ - ou  $\beta$ -secretases que iniciam duas vias diferentes, a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica, respectivamente. Quando APP é clivada pela  $\alpha$ -secretase, forma um fragmento extracelular solúvel sem toxicidade. Quando APP é clivada pela  $\beta$ -secretase, gera um fragmento solúvel extracelular, sAPP $\beta$ , e um fragmento carboxi-terminal CTF99 que é clivado pela ação da  $\gamma$ -secretase formando um fragmento  $\beta A$ . O peptídeo  $\beta A$  (monômero) tende a se agregar formando oligômeros e protofibrilas que posteriormente se agregam dando origem as fibrilas, as quais compõe as placas senis. Fonte: Adaptado de Heppner et al., 2015.

As placas senis resultam principalmente do acúmulo anormal e deposição do peptídeo  $\beta A$  com 40 ou 42 resíduos ( $\beta A_{1-40}$  e  $\beta A_{1-42}$ ) (Serrano-Pozo et al., 2011). O peptídeo  $\beta A_{1-42}$  exibe propriedades hidrofóbicas mais elevadas que o peptídeo  $\beta A_{1-40}$ , sendo assim, é mais suscetível a estar envolvido na formação de oligômeros e fibrilas, as quais

formam as placas senis (Haass e Selkoe, 2007). Estas alterações são observadas em regiões cerebrais como o córtex entorrinal e o hipocampo, responsáveis pelas funções cognitivas como aprendizagem e memória (Selkoe, 2008).

Porém, sabe-se que os oligômeros de  $\beta A$  (mesmo na ausência de placas amiloides) podem prejudicar a plasticidade sináptica, inibir a potenciação de longa duração, do inglês *long term potentiation* (LTP), induzir hiperfosforilação da tau e ativar a micróglia, levando a neuroinflamação, e prejudicando a memória de roedores adultos normais (Barry et al., 2011; Borlikova et al., 2013; Yang et al., 2017). Com a agregação dos oligômeros  $\beta A_{1-42}$  em fibrilas, a ativação da micróglia, produção de citocinas e mediadores inflamatórios é ainda mais exacerbada, comparando-se às alterações observadas em modelos utilizando lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias (Ferrera et al., 2014).

## 1.2 Neuroinflamação na DA

A neuroinflamação é definida como a ativação do sistema imune cerebral, e a sua principal função consiste em proteger o sistema nervoso central (SNC) contra insultos infecciosos, lesões ou patologias (Spencer et al., 2012). A neuroinflamação desempenha um papel crítico na patogênese da DA (Ferreira et al., 2014). Vários estudos observaram a presença de marcadores inflamatórios no cérebro de pacientes com DA, incluindo níveis elevados de citocinas/quimiocinas e microgliose (ativação da micróglia) (Britschgi e Wyss-Coray, 2007; Swardfager et al., 2010; Czirr e Wyss-Coray, 2012; Ferreira et al., 2014).

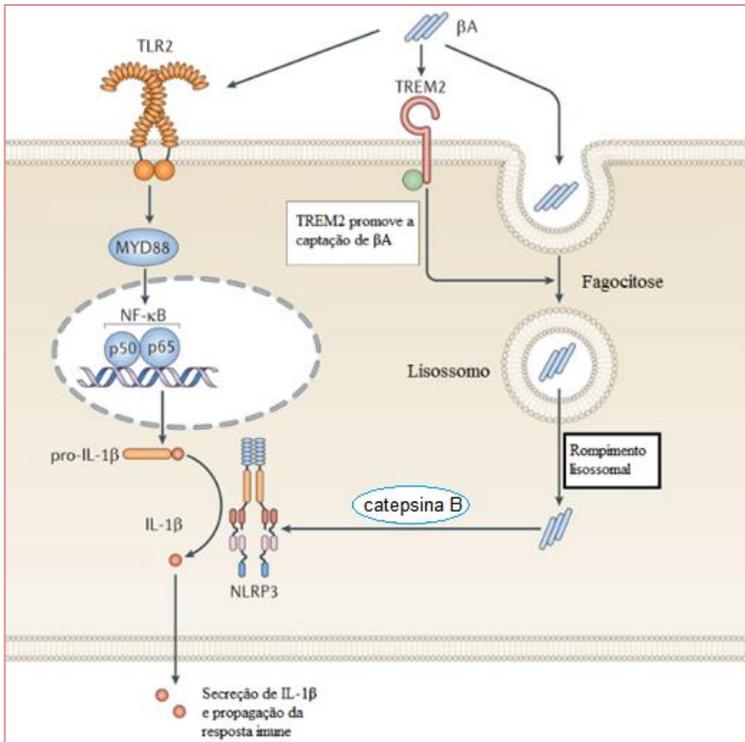
O aumento de citocinas pró-inflamatórias é observado no soro, cérebro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com a doença (Jack et al., 2013; Zhang et al., 2013b; Dursun et al., 2015). Dentre essas citocinas estão o fator de necrose tumoral  $\alpha$ , do inglês, *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e IL-1 $\beta$  (Swardfager et al., 2010). O aumento de marcadores inflamatórios está relacionado ao prejuízo cognitivo observado na DA, sendo que diversos estudos observaram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão associados ao declínio cognitivo em pacientes que se encontravam em diferentes fases da DA, e também em idosos com comprometimento cognitivo leve (Solfrizzi et al., 2006; Harries et al., 2012; Westin et al., 2012). Os estudos relacionando a DA e inflamação cresceram substancialmente após os estudos de associação ampla do genoma observarem polimorfismos em vários genes relacionados com a resposta inflamatória e imunidade inata em pacientes

com DA, como citado anteriormente (Lambert et al., 2013; Ramanan et al., 2015; Ridge et al., 2016).

A micróglia representa o principal componente celular do sistema imune inato no cérebro, envolvida no reconhecimento e na modulação de processos imunes e inflamatórios (Nayak et al., 2014). A superfície das células microgлияis está equipada com numerosos transportadores, canais e receptores, incluindo receptores de reconhecimento de padrões, do inglês, *pattern recognition receptors* (PRRs), capazes de reconhecer moléculas potencialmente nocivas e ativar o sistema imune inato (Kigerl et al., 2014). Estudos recentes têm demonstrado que o peptídeo  $\beta A$  pode ativar os PRRs e conseqüentemente, desencadear uma resposta imune (Lin et al., 2013a; Serrano-Pozo et al., 2013; Serrano-Pozo et al., 2016; Yang et al., 2017; Zolezzi e Inestrosa, 2017). A neuroinflamação ocasionada pelo peptídeo  $\beta A_{1-42}$  ocorre inicialmente pela ativação de receptores toll-like 2 (TLR2), 4 e 6 (Udan et al., 2008; Liu et al., 2012a), induzindo a ativação do sistema imune e produção de vários mediadores inflamatórios, (Cuello et al., 2010; Lin et al., 2013b). Além da relação direta da neuroinflamação com o peptídeo  $\beta A_{1-42}$ , o aumento de citocinas tem sido associado com o aumento da fosforilação da tau e a diminuição dos níveis sinaptofisina, influenciando assim, na instabilidade do citoesqueleto e levando à morte neuronal e alterações sinápticas na DA (Quintanilla et al., 2004).

Uma das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na fisiopatologia da DA é a IL-1 $\beta$ , a qual é produzida como precursor, a pró-IL-1 $\beta$ , e requer clivagem para se tornar biologicamente ativa. Para que isso ocorra, a pró-IL-1 $\beta$  sofre ação de um grupo de proteínas intracelulares que formam um complexo proteico conhecido como inflamassoma NLRP3, do inglês *oligomerization domain-like receptor family pyrine domain-containing 3* (Heneka et al., 2013; Parajuli et al., 2013). Quando ocorre a ativação dos TLRs por  $\beta A$  ou outra molécula potencialmente danosa, ocorre a transdução do sinal pró-inflamatório, através da ativação da proteína mielóide de resposta primária 88, do inglês, *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), que leva a ativação do fator nuclear kappa B, do inglês, *nuclear factor kappa B* (NF-kB), que leva a transcrição de citocinas, principalmente IL-1 $\beta$ . Ao mesmo tempo, fragmentos de  $\beta A$  estão sendo fagocitados pela micróglia, porém, com a sobrecarga de  $\beta A$ , a micróglia não consegue degradar de forma eficiente esses fragmentos, levando ao rompimento do lisossomo, liberando catepsina B, que induz a montagem do inflamassoma NLRP3 (Halle et al., 2008; Heneka et al., 2014; Yang et al., 2014). O inflamassoma NLRP3 através da ativação de caspases, cliva a

inteleucina pró-IL-1 $\beta$  gerando a forma madura desta, que por sua vez ativa neutrófilos, macrófagos e outras células microgлияis, amplificando a resposta inflamatória (Tan et al., 2013). A sinalização descrita acima está ilustrada na figura 2. Esse mecanismo inflamatório vem sendo cada vez mais relacionado às doenças neurodegenerativas, principalmente com a DA (Heneka et al., 2013; Parajuli et al., 2013; Daniels et al., 2016; Zhou et al., 2016; Song et al., 2017).



**Figura 2:** Ativação dos receptores toll-like (TLRs). Quando fragmentos de  $\beta A$  ou outra molécula nociva ativam os TLRs ocorre a transdução de sinal inflamatório, através da ativação da proteína mieloide de resposta primária 88 (MyD88), que leva a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa B$ ), ocasionando a transcrição de interleucinas, principalmente IL-1 $\beta$ . Com a sobrecarga da fagocitose de  $\beta A$  a micróglia não consegue degradar de forma eficiente esses fragmentos, levando ao rompimento do lisossomo, liberando catepsina B, que induz a montagem do inflamassoma NLRP3. O inflamassoma NLRP3, através da ativação de caspases, cliva a inteleucina pró-IL-1 $\beta$  gerando a forma madura desta, propagando a resposta inflamatória. Fonte: Adaptado de Heneka et al., 2014.

Apesar da neuroinflamação ser um evento chave na DA, nem toda resposta inflamatória na doença é nociva. Para que ocorra a limpeza de fragmentos  $\beta$ A, redução da toxicidade e formação de placas senis é necessária a ativação imune e fagocitose desses fragmentos (Daniel Lee e Landreth, 2010). A ativação da micróglia pode ocorrer de duas formas: “tipo M2” ou do “tipo M1” (Heneka et al., 2014). A ativação do tipo M2 da micróglia está associada com a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4 e IL-10, e aumento da atividade fagocítica, induzindo a fagocitose de fragmentos  $\beta$ A, prevenindo assim, o acúmulo e formação das placas senis (Latta et al., 2015). Por outro lado, a ativação do tipo M1 está associada a uma resposta exacerbada e crônica da micróglia, em resposta a uma ativação persistente e continuada, que pode ocorrer pela ativação ocasionada por fragmentos  $\beta$ A ou até mesmo restos celulares provenientes da morte neuronal, ocasionando aumento da expressão de óxido nítrico sintase induzível, do inglês, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), desregulação de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) e o fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *Nerve growth factor*), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Ferreira et al., 2014; Tang e Le, 2015).

O conceito de polarização M1 e M2 de macrófagos foi presumido a partir do conceito de ativação dicotômica clássica das células Th1 e Th2 (Bretscher, 2014). Outros estudos defendem o conceito de polarização da micróglia induzida por LPS (M1) ou IL-4/IL-13 (M2) (Ransohoff, 2016). No entanto, estudos atuais defendem que essa polarização de macrófagos ou células microgliais em M1 ou M2 parece simplificada demais, pela diversidade e grau de plasticidade dessas células (Nakagawa e Chiba, 2014; Cunha et al., 2016; Sousa et al., 2017). Atualmente, com as novas tecnologias para o estudo aprofundado da micróglia esse conceito de polarização está ficando ultrapassado, uma vez que limita muito a atividade tão complexa dessa célula (Ransohoff, 2016). De qualquer forma, sabe-se que a micróglia pode apresentar respostas divergentes, que podem ser benéficas como a fagocitose de restos celulares e fragmentos  $\beta$ A, induzindo a resolução da resposta inflamatória, ou contribuir para a neuroinflamação crônica, causando ainda mais danos e contribuindo para progressão da DA (Heneka et al., 2014). Assim, a ativação ou inibição da micróglia é controversa e deve ser considerada quando investigadas novas intervenções farmacológicas.

### 1.3 Fatores neurotróficos na DA

A desregulação dos níveis de fatores neurotróficos também é uma característica importante da DA (Counts et al., 2016). Dentre estes, destacam-se o BDNF e o NGF, que estão envolvidos em funções importantes no cérebro adulto, incluindo sobrevivência neuronal, desenvolvimento e plasticidade (Allen et al., 2013). A deficiência ou desregulação dos fatores neurotróficos ou de seus receptores, podem causar danos aos neurônios, levando a degeneração neuronal progressiva, podendo desencadear demências como a DA (Belrose et al., 2014; Sopova et al., 2014).

O BDNF é uma pequena proteína dimérica, considerada a neurotrofina mais abundante no cérebro adulto, expresso diferencialmente em vários tecidos cerebrais, é abundantemente expresso no hipocampo, córtex cerebral, amígdala, e cerebelo de mamíferos (Adachi et al., 2014). O BDNF tem papel essencial no desenvolvimento e na manutenção de funções cerebrais e é capaz de mediar muitos processos, incluindo diferenciação e crescimento neuronal, formação de sinapses e neuroplasticidade (Park e Poo, 2013).

O papel do BDNF já é bem estabelecido, ele age através da ligação com seus receptores: o receptor tropomiosina quinase B (TrkB, do inglês, *Tropomyosin receptor kinase B*) e receptor p75 (Gonzalez, Moya-Alvarado et al. 2016). O BDNF é sintetizado primeiramente na forma precursora chamada pró-BDNF, e a ativação dos receptores de pró-BDNF parece levar a redução das atividades sinápticas, e facilitar a apoptose, mediada principalmente por receptores p75. Por outro lado, o BDNF maduro parece se ligar preferencialmente ao receptor TrkB, levando aos efeitos tróficos dessa neurotrofina (Budni et al., 2015a). Os níveis de BDNF no cérebro parecem variar de acordo com a gravidade da DA (O'Bryant et al., 2009).

O NGF é uma glicoproteína que exerce seus efeitos através da ligação em receptores TrkA, p75 e sortilina (Esposito et al., 2001). O NGF também possui a forma precursora, o pro-NGF, e a forma madura, o NGF. O efeito trófico de NGF é mediado através de receptores TrkA e p75, enquanto que o efeito neurotóxico do pro-NGF é mediada através de p75 em conjunto com sortilina (Budni et al., 2015b). O NGF é expresso em neurônios e células gliais, e seus efeitos incluem sobrevivência, diferenciação e neuroplasticidade (Isaev et al., 2017).

O NGF também regula a expressão de acetilcolina, sendo que na DA é observada redução deste neurotransmissor, acompanhado da redução no número de neurônios colinérgicos e consequente redução da

inervação colinérgica no hipocampo (Perry et al., 2012; Zhang et al., 2013a; Ferreira et al., 2015). Foi observado em pacientes com DA que os níveis de pró-NGF se encontram elevados no córtex, levando à hipótese de que o pró-NGF possa contribuir para neurodegeneração, podendo ser inclusive estudado como um possível marcador para doença (Fahnestock et al., 2001; Peng et al., 2004; Mufson et al., 2012). Além disso, foi observado também aumento dos níveis de NGF no LCR de pacientes com DA (Blasko et al., 2006). Esses estudos reforçam o papel importante do NGF e pró-NGF na DA.

#### **1.4 Tratamento da DA**

Nos últimos anos as pesquisas de novos fármacos para tratar a DA têm aumentado substancialmente, o motivo é o impacto econômico e social gerado pela doença. Dentre esses estudos, vale destacar as imunoterapias contra o  $\beta A$ , que quando surgiram causaram grandes expectativas, sendo que várias ainda estão sob investigação clínica com o objetivo de reduzir a carga de  $\beta A$  no cérebro de pacientes com DA. No entanto, apesar de alguns resultados positivos (Hull et al., 2017), a eficácia contra danos cognitivos desses medicamentos ainda é incerta (Panza et al., 2011; Brody et al., 2016; Rygiel, 2016), além da ocorrência de efeitos adversos graves ocasionados por alguns desses fármacos, como edema vasogênico, micro hemorragias cerebrais e encefalite (Liu et al., 2012c). Além destes, vários outros estudos clínicos estão em andamento com o uso de inibidores da  $\beta$ -secretase, quelantes, vitaminas, anti-inflamatórios, estatinas, enfim, muitas possibilidades. Porém esses estudos ainda não são conclusivos, mostraram pouco efeito, ou se mostraram falhos (Cazarim Mde et al., 2016; Evin, 2016; Grimm et al., 2016; McGuinness et al., 2016; Prati et al., 2016).

Até o momento, não há nenhum tratamento que leve a cura para a doença, ou mesmo, que evite a progressão da mesma. O tratamento medicamentoso disponível atualmente está voltado apenas na prevenção do agravamento dos sintomas (Ramirez-Bermudez, 2012). Os únicos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) são quatro inibidores da enzima acetilcolinesterase (que aumentam a concentração de acetilcolina na fenda sináptica) e a memantina (antagonista de receptores NMDA, que reduz a excitotoxicidade glutamatérgica) (Ramirez-Bermudez, 2012). Uma recente revisão sistemática e meta-análise, concluiu que a utilização de uma combinação de anticolinesterásicos e memantina funciona melhor que a monoterapia, porém, a força desta

recomendação é fraca, já que esta combinação ainda não pode impedir o avanço da doença (Schmidt et al., 2015).

Dessa forma, os tratamentos disponíveis para DA agem apenas em duas características fisiopatológicas da doença, que envolvem a redução de neurônios colinérgicos e a excitotoxicidade glutamatérgica. Os medicamentos que reduzem o  $\beta$ A que surgiram como uma alternativa para o tratamento da DA, não foram tão promissores como esperado, já que não conseguiram conter o avanço da doença (Rygiel, 2016). Outra potencial categoria de fármacos que está sendo estudado para o tratamento da DA são os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), uma vez que a utilização crônica de AINEs foi associada com um decréscimo do risco de desenvolver a doença (Szekely e Zandi, 2010; Wang et al., 2015a; Cacciatore et al., 2016; Nevado-Holgado e Lovestone, 2017). Estudos também mostraram redução de placas amiloides em ratos tratados com AINEs (Weggen et al., 2001; Weggen et al., 2003; Prade et al., 2015). Ainda não está claro o mecanismo neuroprotetor dos AINEs, mas esses fatos suportam a ideia de que a inflamação é uma característica fisiopatológica chave na DA, e o desenvolvimento de abordagens farmacoterapêuticas, levando em consideração essa característica, devem ser investigados para o tratamento da doença.

### **1.5 O cloridrato de minociclina como uma alternativa farmacológica na DA**

O cloridrato de minociclina é um análogo semissintético da tetraciclina com ação antimicrobiana bacteriostática, inibindo a síntese proteica, com amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. É utilizado há mais de 30 anos e ultimamente sua utilização é mais comum no tratamento da acne vulgar (Garrido-Mesa et al., 2013). A minociclina é uma molécula altamente lipofílica, por via oral é rapidamente absorvida e pode facilmente ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) (Colovic e Caccia, 2003). O tratamento a longo prazo em dosagens de até 200 mg/dia é considerado pela FDA bem tolerado e seguro em seres humanos, sendo os efeitos adversos mais comuns, náuseas, irritação gastrointestinal, vertigens e tontura moderada, que desaparecem com a descontinuação do tratamento (Group, 2004).

Além dos seus efeitos antibacterianos, a minociclina possui propriedades anti-inflamatórias independentes da sua ação antimicrobiana, exercendo capacidade neuroprotetora, limitando a inflamação e o estresse oxidativo (Kuang et al., 2009). Em estudos pré-clínicos a minociclina apresentou atividade neuroprotetora em várias

doenças neurodegenerativas, tais como, doença de Parkinson (Wu et al., 2002), esclerose lateral amiotrófica (Zhu et al., 2002), doença de Huntington (Chen et al., 2000) e DA (Choi et al., 2007; Noble et al., 2009; Parachikova et al., 2010). Assim, este fármaco se mostrou uma possível alternativa farmacológica para a DA.

Inicialmente, em um estudo *in vitro* foi demonstrado que o tratamento com tetraciclina e doxiciclina inibiu a atividade amiloidogênica, inibindo a formação de agregados  $\beta$ A, evitando a formação das placas senis e também desmontando as placas pré-formadas (Forloni et al., 2001). Porém, o primeiro estudo que utilizou o tratamento com minociclina em modelo de DA em roedores foi conduzido por Hunter et al. (2004), no qual os ratos receberam injeções bilaterais no ventrículo cerebral da toxina Mu p75- saporin (SAP), que induz a perda seletiva de neurônios colinérgicos, e essa degeneração neuronal foi reduzida pelo tratamento com minociclina. A partir destes, vários estudos visaram desvendar os mecanismos pelo qual a minociclina exerce ação neuroprotetora, e observaram que a minociclina pode inibir a proteína cinase ativada por mitógeno p38, do inglês, *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) e as metaloproteinases da matriz-9, do inglês, *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9) (Tikka et al., 2001; Hunter et al., 2004) regulando assim, a produção de mediadores inflamatórios.

Foi observado também que a minociclina reduziu a fosforilação da tau (Noble et al., 2009; Cai et al., 2013) e reduziu fragmentos  $\beta$ A (Forloni et al., 2001; Cuello et al., 2010; Parachikova et al., 2010; Ferretti et al., 2012; Cai et al., 2013) em modelos de DA em camundongos transgênicos. Em culturas de células expostas ao glutamato e ao peptídeo  $\beta$ A, a incubação com minociclina impediu a ativação de caspases e indução de morte celular (Noble et al., 2009). Outros estudos também mostram que a minociclina inibiu vias apoptóticas (Chen et al., 2000; Wang et al., 2004; Noble et al., 2009) e a expressão de caspase-1 e caspase-3 em um modelo animal de doença de Huntington (Chen et al., 2000). As caspases além de estarem intimamente associadas com a indução da cascata apoptótica e morte celular, podem clivar a APP e a proteína tau (Dickson, 2004). Além disso, após a ativação do inflamassoma NLRP3, ocorre a maturação da caspase-1, amplificando a resposta inflamatória (Tan et al., 2013). Assim, há grandes chances que um dos mecanismos de ação da minociclina seja evitar a formação do inflamassoma, mas isso ainda não foi testado experimentalmente. Todos os estudos pré-clínicos citados utilizando a minociclina, realizados em modelos animais de DA até o momento, estão resumidos em um artigo de revisão publicado recentemente (Budni et al., 2016).

Com os efeitos neuroprotetores da minociclina, de forma crescente, sendo comprovados em estudos pré-clínicos, foram iniciados estudos clínicos para testar a minociclina em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, como esquizofrenia (Levkovitz et al., 2010; Liu et al., 2014), doença de Parkinson, no estudo realizado pela NINDS NET-PD Investigators (2006), doença de Huntington (Bonelli et al., 2004) e esclerose lateral amiotrófica (Gordon et al., 2004). Alguns estudos obtiveram resultados positivos na cognição desses pacientes, outros não foram tão promissores (Gordon et al., 2007; Group, 2010). Em 2014 foi iniciado um ensaio clínico de fase II, multicêntrico, duplo-cego, randomizado e controlado com placebo com a minociclina, em pacientes com DA, chamado *Minocycline in Alzheimer's Disease* (MADE), realizado pelo King's College London (2015). Se este estudo mostrar resultados promissores, será um impulso para ensaios clínicos de Fase III. Porém os resultados preliminares deste estudo ainda não foram divulgados, sendo a previsão para dezembro de 2017.

Assim, a minociclina parece ser uma alternativa farmacológica promissora para a DA, uma vez que ainda não há nenhum fármaco aprovado para doença que tenha ação anti-inflamatória, mesmo a neuroinflamação sendo um mecanismo chave na fisiopatologia da DA. Portanto, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação da minociclina na neuroinflamação, assim como, propor alternativas farmacológicas para a doença que possam atuar em diferentes mecanismos fisiopatológicas da DA.

## 1.6 Modelos de DA em roedores

Os roedores são as espécies animais mais utilizadas para pesquisa pré-clínica. Dentre os motivos estão sua relação filogenética e à sua semelhança fisiológica com os seres humanos, a facilidade de mantê-los e criá-los em laboratório, sua rápida reprodução e seu período de vida curto (estimado em no máximo 3 anos), facilitando os estudos com envelhecimento por exemplo (Perlman, 2016).

Modelos de roedores com modificações genéticas e transgênicos, que expressam mutações genéticas específicas de doenças neurodegenerativas auxiliam na pesquisa dos mecanismos patogênicos das demências e da DA (Shepherd et al., 2016). Para modelos animal de DA são utilizados camundongos transgênicos com mutações nos genes da APP, PSEN1, PSEN2, e ApoE (Elder et al., 2010), os quais desenvolvem a patologia amilóide idade-dependente, com deposição de placas  $\beta$ A similares ao que se encontra em pacientes diagnosticados com DA, além

de apresentarem prejuízo memória visuoespacial (Stover e Brown, 2012). Há também modelos transgênicos que expressam mais de uma mutação concomitantemente, como os modelos, APP/PS1 (Schmitz et al., 2004), 5XFAD (Schneider et al., 2014), APP/tau (Lewis et al., 2001) e triplo transgênico 3xTgAD (Oddo et al.), que apresentam perda neuronal, acúmulo de  $\beta$ A e hiperfosforilação da tau, todas características da doença em um só animal.

No presente estudo foi utilizado um modelo não transgênico de DA esporádica, induzido pela administração de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> intracerebroventricular. Este modelo induz características neuroquímicas e fisiopatológicas semelhantes à DA em roedores, uma vez que causa morte neuronal, alterações inflamatórias, comportamentais e cognitivas em ratos e camundongos (Poling et al., 2008; Ruiz-Muñoz et al., 2011; Prakash et al., 2013; Liu et al., 2015; Wang et al., 2016a; Garcez et al., 2017). Com a administração dos oligômeros  $\beta$ A<sub>1-42</sub> diretamente no cérebro, é possível avaliar a toxicidade ocasionada especificamente pelas espécies  $\beta$ A<sub>1-42</sub> em roedores. Sendo essa a característica fisiopatológica mais implicada na DA. Os danos de memória causados pelo  $\beta$ A<sub>1-42</sub> iniciam 7 dias após a administração, podendo durar até 21 dias, o acúmulo de  $\beta$ A, o dano oxidativo e a inflamação também persistem mesmo 21 dias após a administração aguda dos oligômeros (Prakash et al., 2013).

## 1.7 Justificativa do estudo

A DA constitui um problema de saúde pública de grande impacto social e financeiro, já que é uma doença neurodegenerativa progressiva e nos estágios mais avançados o indivíduo fica completamente dependente dos familiares e cuidadores. Assim, a DA causa um enorme sofrimento para os indivíduos afetados e suas famílias. Segundo a *Alzheimer's Association* (2015), ocorrerá uma grande sobrecarga nos sistemas de saúde em todo o mundo, uma vez que, são esperados que os custos mundiais com a doença ultrapassem U\$\$ 1 trilhão de dólares anuais em 2050 considerando os custos com medicamentos e cuidados ao paciente.

O tratamento farmacológico disponível atualmente para DA é apenas paliativo, não sendo capaz de evitar o desfecho da doença ou a sua evolução (Schmidt et al., 2015). A neuroinflamação emergiu como um importante mecanismo fisiopatológico da DA, já que os estudos da associação ampla do genoma observaram polimorfismos em vários genes relacionadas com a resposta inflamatória, endocitose e fagocitose em pacientes (Lambert et al., 2013; Ramanan et al., 2015; Ridge et al., 2016). Porém os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da DA agem

apenas aumentando a transmissão colinérgica e reduzindo a excitotoxicidade glutamatérgica, não abrangendo toda a fisiopatologia da doença, tornando-se necessário mais estudos para encontrar novos alvos farmacológicos para o tratamento da DA.

No presente estudo foi proposto o tratamento com cloridrato de minociclina em um modelo animal de demência do tipo DA. Assim, a minociclina parece ser uma alternativa farmacológica promissora para a DA, uma vez que ainda não há nenhum fármaco aprovado para a doença que tenha ação anti-inflamatória, mesmo a neuroinflamação sendo um mecanismo chave na fisiopatologia da DA. A minociclina é uma molécula altamente lipofílica, que ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica e apresenta atividade neuroprotetora em várias doenças neurodegenerativas (Chen et al., 2000; Wu et al., 2002; Zhu et al., 2002), inclusive na DA (Choi et al., 2007; Noble et al., 2009; Parachikova et al., 2010). Com isso, este fármaco parece ser uma possível alternativa farmacológica para a DA, porém, os mecanismos neuroprotetores desse medicamento na doença ainda não estão elucidados, justificando assim, a relevância do presente estudo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com cloridrato de minociclina na memória e neuroinflamação induzida pela administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$  em camundongos Balb/c.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a locomoção de camundongos Balb/c tratados com cloridrato de minociclina após a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$ ;
- Avaliar a memória espacial de camundongos Balb/c tratados com cloridrato de minociclina após a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$ ;
- Avaliar a memória de trabalho de camundongos Balb/c tratados com cloridrato de minociclina após a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$ ;
- Avaliar a memória aversiva de camundongos Balb/c tratados com cloridrato de minociclina após a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$ ;
- Avaliar os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 e IL-10) em córtex total, hipocampo e soro de camundongos Balb/c tratados com cloridrato de minociclina após a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$ ;
- Avaliar os níveis das neurotrofinas BDNF e NGF em córtex total, hipocampo e soro de camundongos Balb/c tratados com cloridrato de minociclina após a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$ ;
- Realizar o conteúdo e a imunomarcagem de peptídeo  $\beta A$ , do marcador pré-sináptico sinaptofisina, do marcador de ativação microglial iba-1, e da via de sinalização de inflamação *toll-like 2*, MyD88 e NLPR3, no hipocampo de camundongos Balb/c tratados com cloridrato de minociclina após a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$ ;
- Avaliar a viabilidade neuronal em cortes histológicos de hipocampo de camundongos Balb/c tratados com cloridrato de minociclina após a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$ ;



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

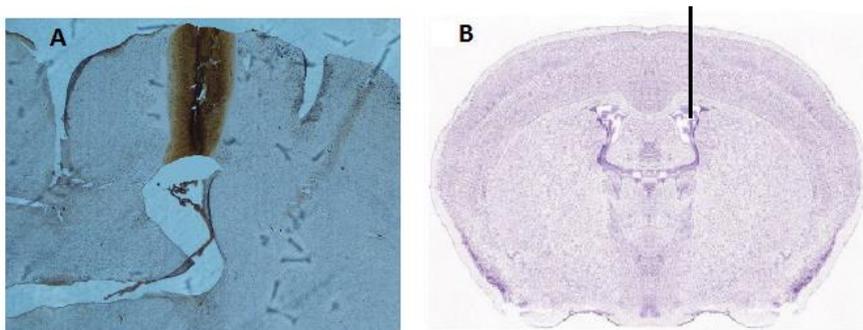
Foram utilizados no presente estudo camundongos Balb/c machos com 100 dias de idade quando iniciado o experimento, pesando 30-40 g procedentes do biotério da UNESC. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com alimento e água disponíveis. Eles foram alojados em gaiolas de plástico com maravalha. Todas as manipulações foram realizadas entre às 8h e às 16h. O comitê de ética local (Comitê de Ética em Uso Animal - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense) aprovou este estudo sob o número de protocolo 052/2016-2 em substituição ao protocolo inicial número 080/2015-1. Todos procedimentos experimentais foram executados dentro das diretrizes do Conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA).

#### 3.2 Indução do modelo animal pela administração de oligômeros $\beta A_1$ .

42

O peptídeo  $\beta A_{1-42}$  (Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi dissolvido numa solução de tampão fosfato (NaCl 137 mM,  $Na_2HPO_4$  10 mM,  $KH_2PO_4$  1,8 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5) na concentração de 1  $\mu g/\mu L$ . A solução foi incubada durante 7 dias em estufa a 37 °C e 5% de  $CO_2$  para permitir a agregação dos peptídeos  $\beta A_{1-42}$  em oligômeros (Ueda et al., 1994; Resende et al., 2008; Ruiz-Muñoz et al., 2011). Após a agregação a solução foi armazenada a -20 °C até a sua utilização. No dia da administração a solução foi diluída na dose final de 100 pmol/ $\mu L$  em líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) (NaCl 24 mM, KCl 2,5 mM,  $MgSO_4$  2,0 mM,  $KH_2PO_4$  1,25 mM, 26 mM de  $NaHCO_3$ , glucose 10 mM e sacarose 4 mM). Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (1,5%) utilizando um aparelho de anestesia inalatória. Os oligômeros  $\beta A$  foram injetados através de uma agulha de aço inoxidável de calibre 28 com 3 mm de comprimento acoplada a uma seringa de Hamilton. A agulha foi inserida unilateralmente através da pele e do crânio diretamente no ventrículo lateral esquerdo. A localização do bregma foi realizada pela visualização de um triângulo equilátero, traçando uma linha entre os olhos e a parte superior aos olhos do camundongo, e a partir desse ponto, foi medido 1mm posterior e 1mm para lateral esquerda, a agulha foi inserida nesse ponto a uma profundidade de 2,5mm (figura 3) (Laursen e Belknap, 1986; Gomes et al., 2013). Os oligômeros  $\beta A$  foram injetados no volume

de 4  $\mu$ l (400 pmol/sítio) ao longo de um período de 10 segundos, seguido por um atraso de 10 segundos para permitir a total difusão da solução.



**Figura 3:** Local da injeção dos oligômeros  $\beta A_{1-42}$  em camundongos Balb/c. A figura A mostra a localização da injeção do  $\beta A_{1-42}$ . Um camundongo Balb/c foi injetado no ventrículo lateral esquerdo com  $\beta A_{1-42}$  (400 pmol) e imediatamente após, foi realizada a retirada do cérebro para marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti- $\beta A$  para visualização do local da injeção; a figura B mostra a estimativa de localização onde foi realizada a injeção i.c.v. de acordo com o Atlas Allen Mouse Brain. Fonte: Do autor.

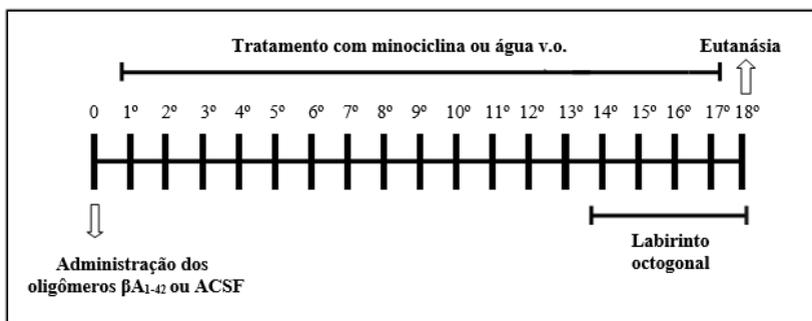
### 3.3 Tratamento e desenho experimental

O cloridrato de minociclina (Ranbaxy Laboratories) foi diluído em água para administração oral (v.o.) na dose de 50 mg/kg de peso corporal do camundongo, administrado por gavagem, uma vez por dia (15 horas da tarde), durante um período de 17 dias (Garwood et al., 2010; Ferretti et al., 2012). O tratamento foi iniciado 24 horas após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) dos oligômeros  $\beta A_{1-42}$ . Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: animais controle, que recebem ACSF i.c.v. e água v.o. (ACSF + água), controle minociclina, que receberam ACSF i.c.v. e minociclina 50 mg/kg v.o (ACSF + minociclina), modelo animal de demência do tipo DA não tratados, que receberam os oligômeros  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. e água v.o ( $\beta A_{1-42}$  + água), e modelo animal de demência do tipo DA tratados com minociclina, que receberam os oligômeros  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. e minociclina 50 mg/kg v.o ( $\beta A_{1-42}$  + minociclina). Os experimentos foram divididos em duas etapas, ambas contendo os mesmos 4 grupos experimentais. Na etapa 1 foi realizado o teste de labirinto octogonal e retiradas amostras para imunoenensaio enzimático e na etapa 2 foram

realizados os testes de campo aberto, labirinto em Y e esquiwa inibitória. Totalizando 48 animais por etapa e 96 animais em todo estudo (figura 4).

### 3.3.1 Etapa 1

Os animais foram administrados com ACSF i.c.v ou  $\beta A_{1-42}$  i.c.v e 24 horas após foi iniciado o tratamento com minociclina 50 mg/kg v.o durante 17 dias. No 14º dia de tratamento com minociclina foi realizada a habituação do teste de labirinto octogonal, no 15º, 16º, 17º e 18º dias do protocolo experimental foi realizado o teste de labirinto octogonal (figura 4). No 18º dia, 24 horas após o último tratamento com minociclina, e após a realização do teste comportamental foi realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical. O sangue foi retirado logo após a decapitação, e o córtex total e o hipocampo foram dissecados e colocados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para posteriores análises bioquímicas.

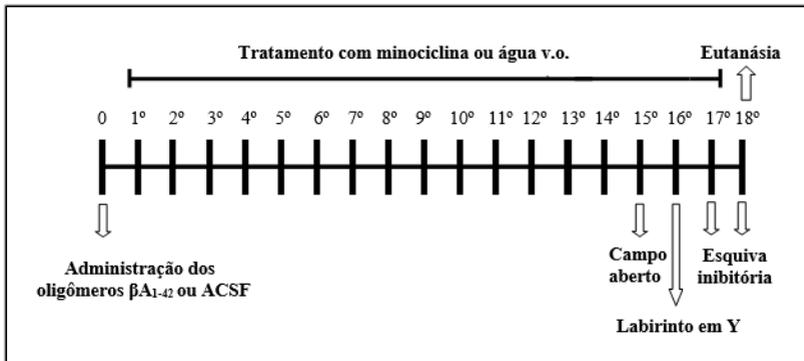


**Figura 4:** Linha do tempo do protocolo experimental da etapa 1. Fonte: Do autor.

### 3.3.2 Etapa 2

Os animais foram administrados com ACSF i.c.v ou  $\beta A_{1-42}$  i.c.v e 24 horas após foi iniciado o tratamento com minociclina 50 mg/kg v.o durante 17 dias. No 15º dia de tratamento com minociclina foi realizado o teste de campo aberto, no 16º dia foi realizado o teste de labirinto em Y, e no 17º e 18º dias do protocolo foi realizado o teste de esquiwa inibitória (figura 5). No 18º dia, 24 horas após o último tratamento com minociclina, e após a realização do teste comportamental foi realizada a eutanásia de metade dos animais por deslocamento cervical (n=6), e o

hipocampo foi dissecado e colocado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises bioquímicas de western blott. A outra metade dos animais ( $n=6$ ) foram perfundidos com salina e paraformoldeído e o encéfalo inteiro foi retirado para as análises de imuno-histoquímica e histologia. Para verificar as proteínas que estavam envolvidas no efeito da minociclina na sinalização inflamatória e viabilidade neuronal, foi utilizado o hipocampo, o qual é descrito ser a estrutura mais afetada na DA (Weiner et al., 2017).



**Figura 5:** Linha do tempo do protocolo experimental da etapa 2. Fonte: Do autor.

### 3.4 Testes comportamentais

#### 3.4.1 Labirinto octogonal

O aparato do labirinto octogonal consiste em 8 braços, numerados de 1 a 8 ( $48 \times 12\text{ cm}$ ), que se estende radialmente a partir de uma área central ( $32\text{ cm}$  de diâmetro). O aparelho é colocado a  $50\text{ cm}$  acima do chão, e possui formas geométricas posicionadas na reta do braço o qual é colocada a recompensa. Esse teste é usado para avaliar a memória espacial. No primeiro dia, os camundongos foram colocados um de cada vez no aparato para explorar livremente durante 5 minutos, sem recompensa, apenas para se habituarem ao equipamento. Após, retornaram a caixa moradia e foram devolvidos ao biotério com um cereal de chocolate (Nescau Cereal®) por animal em cada caixa moradia, para se habituarem a comida (recompensa), juntamente com a ração padrão do biotério, porém essa foi racionada ( $2,5\text{ g}$  por animal) para que no dia seguinte (primeiro dia de teste) os animais estivessem com fome para facilitar a realização da tarefa. No primeiro dia de teste o animal foi

colocado novamente no aparato e quatro dos oito braços do labirinto possuíam a recompensa (cereal), e nestes mesmos braços as pistas geométricas. Cada animal teve 10 minutos para realizar a tarefa de encontrar a recompensa nos 4 braços, quando o animal encontrou as 4 recompensas ou passados os 10 minutos, eles foram devolvidos à caixa moradia, onde novamente foi realizado o racionamento de comida e eles foram devolvidos ao biotério. Esse procedimento foi realizado da mesma forma nos 3 dias subseqüentes, totalizando 4 dias de teste com intervalos de 24 horas. Os parâmetros avaliados foram: tempo total para encontrar a recompensa nos 4 braços; erros totais (nº de entradas) em cada braço para encontrar a recompensa; erros de trabalho (nº de entradas) em braços que a recompensa já havia sido ingerida anteriormente (memória de trabalho); e erros de referência (nº de entradas) em braços que não havia a recompensa (memória de referência) (Foyet et al., 2011; Hritcu et al., 2012). Uma hora após a finalização do teste os animais foram submetidos a eutanásia como descrito anteriormente.

### *3.4.2 Campo aberto*

O campo aberto consiste em um aparato de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual tiveram 5 minutos para explorar livremente o ambiente. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia e para o biotério. Foram medidos os números de “cruzamentos” que o animal realizou através das linhas pretas da caixa, para avaliar a locomoção destes animais (Wang et al.; Salehi-Sadaghiani et al., 2012).

### *3.4.3 Labirinto em Y*

Esse teste é realizado para avaliar a memória de reconhecimento espacial dos animais. O aparelho é feito de MDF preto e possui três braços iguais (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120°. Este foi colocado em uma sala escura com iluminação de lâmpada vermelha, para deixar os animais mais confortáveis para explorar (Deacon e Rawlins, 2006) e com dicas visuais nas paredes do braço para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consiste de duas sessões separadas por um intervalo de 2 horas. Na primeira sessão, o animal foi colocado no final de um dos

braços, chamado de braço de “partida”, e teve livre acesso para explorar o “outro braço” durante 5 min. Nesta sessão inicial, o terceiro braço do labirinto estava bloqueado por uma porta guilhotina. Após os 5 minutos os animais retornaram a caixa moradia. Depois de 2 horas, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no braço de “partida” do labirinto para explorar livremente os três braços durante 5 min, já com o braço que estava fechado anteriormente, chamado de braço “novo” disponível para exploração. O tempo de permanência em cada braço foi registrado, para avaliar a preferência dos animais por explorar o braço “novo” que não pôde ser explorado na primeira sessão (Dellu et al., 1997).

#### *3.4.4 Esquiva inibitória*

O teste de esquiva inibitória é utilizado para avaliar a memória aversiva dos animais. Consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal. Uma plataforma é colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e foi cronometrado o tempo em que o animal levou para descer com as quatro patas (latência), o tempo máximo para o animal descer é de 180 segundos, os animais que não desceram neste tempo foram descartados do estudo. Imediatamente após descer da plataforma, o animal recebeu um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e cronometrado o tempo em que ele levou para descer da plataforma (latência), no tempo máximo de 180 segundos, porém não foi mais administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram de 5 segundos, (para avaliar memória imediata), 1,5 horas (para avaliar memória de curta duração) e 24 horas (para avaliar de longa duração), sempre sem o choque que é aplicado apenas uma vez no treino (Izquierdo et al., 1998; Roesler et al., 2003). Após o término do teste, os animais voltaram à caixa moradia e uma hora depois foi realizada a eutanásia como descrito anteriormente.

### **3.5 Análises Imunoquímicas**

#### *3.5.1 Imunoensaio enzimático*

As amostras de córtex total, hipocampo e soro foram solubilizadas para análise dos níveis das de citocinas e os fatores neurotróficos em tampão fosfato. Foram avaliadas as citocinas TNF- $\alpha$ ,

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 e IL-10, e os fatores neurotróficos BDNF e NGF. Estes foram quantificadas por kits de imunoenensaio enzimático (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme as recomendações do fabricante, descritas a seguir. As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante a noite com o anticorpo de captura. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de lavagem, e em seguida, foram bloqueadas com uma solução de tampão fosfato com albumina 1% durante 1 hora. Após, foram incubadas as amostras homogeneizadas e a curva padrão, diluídas em solução tampão, durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem, e em seguida, incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubado uma peroxidase conjugada com estreptavidina por 20 minutos, e após o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1), e a reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas à 450nm em espectrofotômetro. A proteína total foi mensurada de acordo com Lowry et al. (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

### 3.5.2 *Imunodeteção por western blot*

O hipocampo foi homogeneizado em tampão composto por duodecil sulfato de sódio 4%, Tris 50 mM, EDTA 100mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 8%, pH 6,8. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 14-16% em duodecil sulfato de sódio em um sistema "mini-gel" (BioRad®). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham®), utilizando um sistema de transferência (BioRad). As proteínas de interesse foram identificadas através do uso de anticorpos primários da Merck Millipore, anti-  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (cod. MABN10, USA), sinaptofisina (cod. MAB368, USA), iba-1 (cod. MABN92, USA), TLR2 (cod. 06-1119, USA), MyD88 (cod. Ab16527, USA), NLRP3 (cod. 06-1344, USA) e  $\beta$ -actina da Sigma Aldrich (cod. A2228, USA) incubados na concentração de 1:1000, menos iba-1, que foi utilizado na concentração de 1:500. As membranas foram incubadas *overnight*. Após, foi realizado lavagens com tampão composto por tris básico, e o anticorpo secundário específico (conjugado à peroxidase) foi incubado por 1 hora, e após lavagens foi realizada a revelação das membranas por quimioluminescência utilizando um kit ECL da Amersham®, visualizadas e fotografadas utilizando um fotorevelador. As proteínas foram mensuradas de acordo com o método de Lowry et al. (1951) usando albumina de soro bovina como padrão. A

quantificação foi realizada por densitometria das bandas, utilizando o software ImageJ.

### *3.5.3 Perfusão transcardíaca e realização dos cortes histológicos*

Os camundongos foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p) e foi realizada a perfusão transcardíaca através de uma incisão no ventrículo esquerdo do coração, perfundidos com solução salina (20 mL por animal) seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Os encéfalos foram removidos e colocados em um frasco contendo uma solução de paraformaldeído a 4% durante 24 horas. Após, os cérebros passaram por três banhos de 40 minutos de etanol (Vetec), seguido de três banhos de xileno (Vetec) de 40 minutos cada, e embebidos em cera de parafina (Sigma) a 55 °C em estufa com três imersões de 1 hora cada. Após, os encéfalos foram emblocados em parafina e guardados na geladeira até a realização dos cortes. Os cortes coronais (10µm de espessura) foram realizados utilizando um micrótomo (Yin et al., 2017). Assim que foi iniciada a visualização do hipocampo foi realizado aproximadamente 70 cortes de 10µm e descartados ao longo do eixo rostrocaudal, para chegar na região dorsal do hipocampo referente a posição P56 do Atlas Allen Brain Mouse e Paxinos G e Franklin KBJ (2004). A porção dorsal do hipocampo está intimamente relacionada com a modulação de processos cognitivos tais como aprendizagem, memória, navegação e exploração (Fanselow e Dong, 2010). Para confirmar se todos os cérebros estavam na mesma região hipocampal, os cortes foram visualizados em microscópio para confirmar a mesma morfologia. Os cortes foram utilizados consecutivamente, sendo dois cortes (duplicata) de cada cérebro (n=5 por grupo) utilizadas em ordem para cada anticorpo (quatro anticorpos no total) ou colorações histológicas (duas colorações no total). A visualização e comparação dos cortes foi realizada utilizando o Atlas Allen Mouse Brain e Paxinos G e Franklin KBJ (2004).

### *3.5.4 Imuno-histoquímica*

Os cortes coronais de encéfalo (10µm) foram desparafinizados com três banhos de 5 minutos de xileno (Vetec), e reidratados com três banhos de etanol (Vetec) de 5 minutos. Após, foram lavados em água destilada e realizada a reativação antigênica com tampão citrato em banho-maria na temperatura de 95-98°C. Após, os cortes foram lavados

em tampão fosfato, e foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio diluído em metanol, depois, lavados novamente em tampão e bloqueados em solução de soro de cabra (kit da Millipore, cod. DAB500). Após mais uma lavagem em tampão, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti- ( $\beta A_{1-42}$ , iba-1, TLR2 e NLRP3), os mesmos utilizados para técnica de western blot, diluídos em albumina bovina 2% ou apenas em albumina sem o anticorpo (controle negativo) durante 1 hora. Os controles positivos de cada anticorpo foram: cérebro de camundongo injetado com  $\beta A_{1-42}$  (controle do  $\beta A_{1-42}$ ), baço humano (iba-1), placenta humana (TLR2) e filamentos de actina muscular humana (NLRP3). Após, os cortes foram lavados e incubados com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina biotilado apropriado (kit da Millipore, cod. DAB500) durante 30 minutos. Foram lavados em tampão e adicionada a streptavidina-biotina-peroxidase (kit da Millipore, cod. DAB500) durante 10 minutos no abrigo de luz. Após a lavagem foi colocado a solução de DAB (*3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate*) (kit DAB500 Millipore) por 5 minutos no abrigo de luz, lavadas novamente em tampão, e contra coradas com hematoxilina durante 1 minuto. Após, todos os cortes foram incubados em etanol três vezes de 5 minutos e desidratados com xileno três vezes de 5 minutos, para confecção das lâminas montadas com Entellan® e visualizados no microscópio invertido Eclipse Ti-U da Nikon Instruments, acoplado a uma câmera digital. Foram realizadas fotos do hipocampo bilateralmente, da região CA1, CA3 e giro dentado, no aumento de 200x. A quantificação da imunomarcagem foi realizada pela seleção das regiões identificadas como marcadas positivamente para o cromógeno, as quais foram feitas manualmente através da demarcação direta sobre cada imagem e quantificadas utilizando o comando “Threshold colour” do software Image J.

### 3.5.5 Histologia

Os cortes coronais de encéfalo (10 $\mu$ m) foram desparafinizados com três banhos de 5 minutos de xileno (Vetec), e reidratados com três banhos de etanol (Vetec) de 5 minutos, após, foram lavados em água e corados com hematoxilina (durante 5 minutos) ou violeta cresila (durante 15 minutos) e lavados com água novamente. Os cortes corados com hematoxilina foram corados com eosina durante 1 minuto e lavados em água corrente. Todas as lâminas foram incubadas no etanol três vezes de 5 minutos e desidratados com xileno três vezes de 5 minutos. Após, as

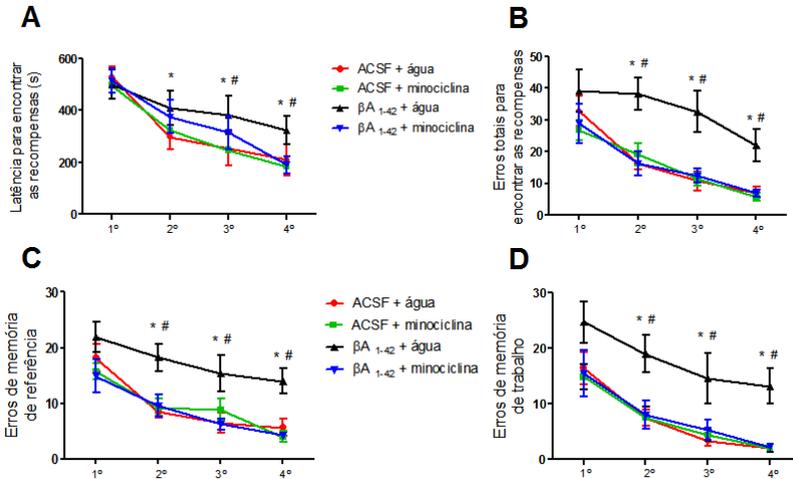
lâminas foram montadas com Entellan®, e visualizadas no microscópio invertido Eclipse Ti-U da Nikon Instruments, acoplado a uma câmera digital. As fotos foram realizadas no aumento de 40x e 200x. A coloração com violeta cresila é chamada de coloração de Nissl e é utilizada para avaliar o número de neurônios e núcleos picnóticos, para isso, os neurônios com aspecto apoptótico ou necrótico de ambos hipocampus (bilateral), de todas as regiões, de cada encéfalo foram contados no aumento de 400x (Dhull et al., 2012). A coloração de hematoxilina-eosina (HE) é utilizada para visualizar possíveis mudanças morfológicas do encéfalo, uma vez que a hematoxilina é utilizada para corar os grupamentos ácidos dos ácidos nucleicos pela coloração roxa e a eosina cora de rosa estruturas acidófilas do citoplasma das células, permitindo a visualização das células cerebrais (Mukumoto et al., 2017).

### 3.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuíam uma distribuição normal. Os resultados do teste de labirinto octogonal foram analisados por análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*repeated measures via two-way ANOVA*), seguido do teste de post hoc Duncan quando o  $p < 0,05$ . Os dados do campo aberto foram analisados por ANOVA de duas vias, o teste de labirinto em Y foi analisado por teste t pareado, considerando o  $p < 0,05$  estatisticamente significativo. Os dados dos testes citados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. O teste de esquivia inibitória foi avaliado pelo teste de Wilcoxon, já que os dados não possuíam distribuição normal considerando o  $p < 0,05$  estatisticamente significativo e os dados estão expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil. Os dados de imunoensaio enzimático e coloração de Nissl foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste post hoc de Tukey quando o  $p < 0,05$ . A correlação entre os níveis de citocinas e os erros totais para encontrar a recompensa no labirinto octogonal foram avaliados pelo coeficiente de correlação linear de Pearson. Os dados bioquímicos de western blot e imuno-histoquímica foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste post hoc de Newman-Keuls quando o  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

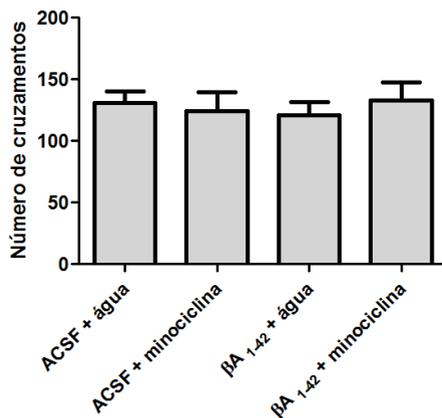
## 4. RESULTADOS

Os resultados do labirinto octogonal foram analisados por análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*repeated measures via two-way ANOVA*), utilizando como fatores o modelo e o tratamento. Os dados apresentaram diferença significativa no teste de ANOVA quando observado a latência para encontrar a recompensa ( $F(3,78) = 4,48$ ;  $p < 0,05$ ), erros totais para encontrar a recompensa [ $F(3,78) = 11,97$ ;  $p < 0,001$ ], erros de memória de referência [ $F(3,78) = 16,57$ ;  $p < 0,0001$ ] e erros de memória de trabalho [ $F(3,78) = 10,25$ ;  $p < 0,001$ ]. Os animais que receberam a administração de oligômeros  $\beta_{A_{1-42}}$  apresentaram comprometimento de memória espacial quando comparados ao grupo controle (que receberam ACSF), quando observada a latência para encontrar a recompensa no 2º, 3º e 4º dias do teste ( $p < 0,01$ ). A minociclina foi capaz de prevenir este dano no 3º ( $p < 0,05$ ) e 4º dias ( $p < 0,05$ ) (figura 6A). A Figura 6B mostra os erros totais para encontrar a recompensa (número de entrada nos braços antes de encontrar as 4 recompensas). Neste caso, os animais administrados com  $\beta_{A_{1-42}}$  cometeram mais erros do que o grupo controle já a partir do segundo dia do teste ( $p < 0,01$ ). Os animais que receberam tratamento minociclina cometeram menos erros quando comparados com os animais submetidos ao modelo de demência no 2º, 3º ( $p < 0,01$ ) e 4º dia de teste ( $p < 0,001$ ). Ao comparar a memória de referência (figura 6C), os animais submetidos ao modelo  $\beta_{A_{1-42}}$  entraram mais vezes em braços que não continham recompensa do que os animais controle ( $p < 0,01$ ). Quando tratados com minociclina houve prevenção dos danos de memória de referência nestes animais no 2º, 3º ( $p < 0,01$ ) e 4º dias de teste ( $p < 0,001$ ). A Figura 6D mostra que a minociclina melhorou a memória de trabalho no 2º, 3º ( $p < 0,01$ ) e 4º dia de teste ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo do modelo de demência do tipo DA, que apresentou comprometimento da memória de trabalho no 2º, 3º ( $p < 0,01$ ) e 4º dia de teste ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle.



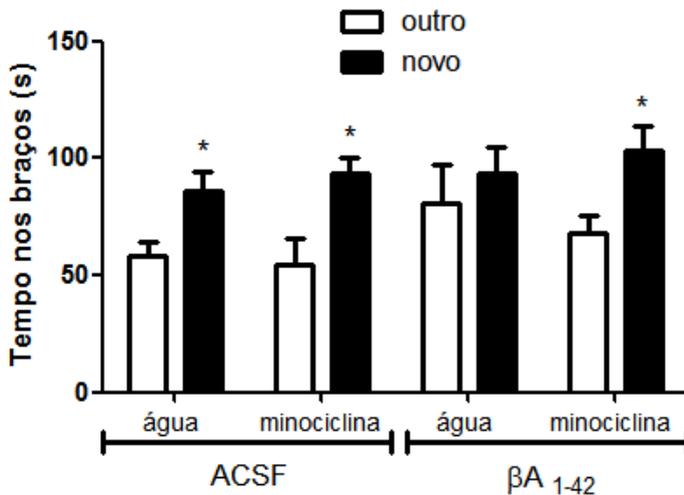
**Figura 6:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg), no teste de labirinto octogonal, em camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura **A** mostra a latência em segundos para encontrar a recompensa nos 4 braços. **B** mostra os erros totais de entrada nos braços antes de encontrar a recompensa nos 4 braços; A figura **C** mostra o número de entradas nos braços que não continham recompensa, considerados erros de memória de referência e **D** mostra o número de entradas nos braços em que a recompensa já havia sido previamente consumida, considerados erros de memória de trabalho. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 10-12 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo de ACSF + água (controle) e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo  $\beta A_{1-42}$  + minociclina.

Não houve alteração da locomoção dos animais em nenhum dos grupos experimentais quando avaliados no teste de campo aberto ( $p=0,90$ ) (figura 7).



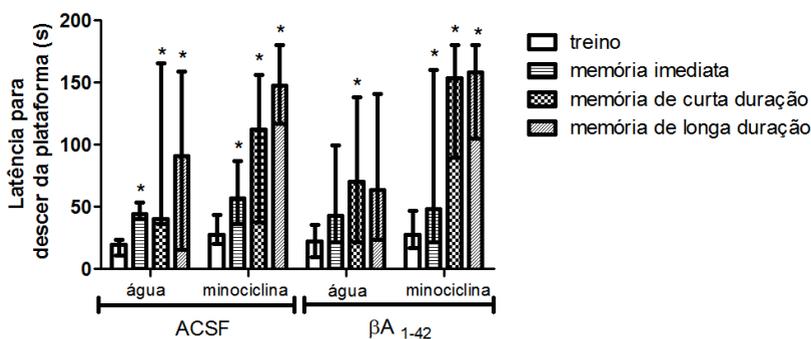
**Figura 7:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) na locomoção de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA avaliada no teste de campo aberto. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 10-12 animais por grupo.

O teste de labirinto em Y (figura 8) foi analisado por teste T de Student pareado e observou-se que os animais controle ficaram mais tempo no braço novo quando comparado ao “outro” braço [ $t(1,10) = 2,41$ ;  $p < 0,05$ ], demonstrando que souberam se localizar espacialmente e reconhecer qual era o braço novo, o mesmo ocorreu com os animais controle minociclina, os quais permaneceram mais tempo no braço novo [ $t(1,10) = 2,37$ ;  $p < 0,05$ ]. Já os animais submetidos ao modelo de demência do tipo DA não foram capazes de reconhecer o braço novo e exploraram tanto quanto o outro braço já explorado anteriormente no treino [ $t(1,10) = 0,50$ ;  $p = 0,62$ ] e a minociclina reverteu esse dano de memória espacial [ $t(1,10) = 2,59$ ;  $p < 0,05$ ].



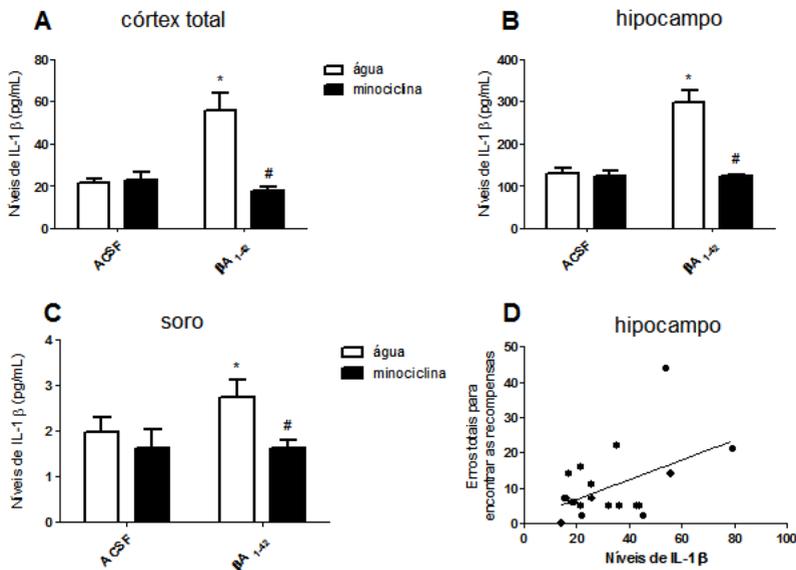
**Figura 8:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) no teste de labirinto em Y em camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura mostra o tempo de exploração em segundos em cada braço do labirinto. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 10-12 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado com o “outro” braço.

A figura 9 mostra o teste de esQUIVA inibitória. Esse teste foi analisado pelo teste não paramétrico Wilcoxon. Os animais controle demonstraram aprendizado da memória imediata, de curta e longa duração ( $p < 0,05$ ). Assim como os animais controle minociclina nas memórias imediata, de curta e de longa duração ( $p < 0,05$ ). Os animais que foram submetidos ao modelo de demência tiveram a retenção apenas da memória de curta duração ( $p < 0,05$ ), porém tiveram danos de memória imediata ( $p = 0,09$ ) e de longa duração ( $p = 0,06$ ), e a minociclina conseguiu prevenir esses danos de memória aversiva, já que os animais do grupo tratado não apresentaram danos em nenhum dos tempos avaliados ( $p < 0,01$ ).



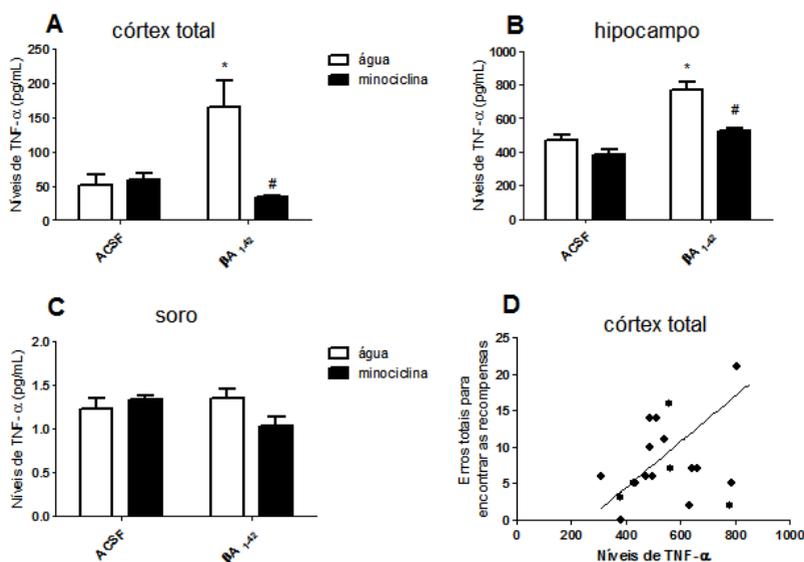
**Figura 9:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) no teste de esQUIVA inibitória em camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura mostra a latência em segundos que os animais levaram para descer da pataforma. 5 segundos após o treino os animais foram recolocados na plataforma para avaliar a memória mediata, 1,5 horas novamente para avaliar a memória de curta duração e 24 horas após o treino para avaliar a memória de longa duração. Os dados são expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil de 10-12 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado com o treino.

A Figura 10 mostra que os níveis de IL-1 $\beta$  aumentaram no córtex total (figura 10A), hipocampo (figura 10B) e soro (figura 10C) dos animais que receberam os oligômeros  $\beta$ A quando comparados com os animais controle. Houve interação entre o modelo e o tratamento no córtex total [F (1,16) = 17,45; p <0,01], hipocampo [F (1,16) = 21,89; p <0,01], e soro (F (1,16) = 5,40, p <0,05), uma vez que a minociclina foi capaz de prevenir o aumento ocasionado pelo  $\beta$ A no córtex total e hipocampo (p<0,001) e no soro (p<0,05). Além disso, houve uma correlação positiva entre os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo e erros totais para encontrar a recompensa no labirinto octogonal (figura 10D) (r = 0,23; p <0,05), mostrando associação entre o aumento dessa citocina pró-inflamatória no hipocampo e o dano de memória espacial.



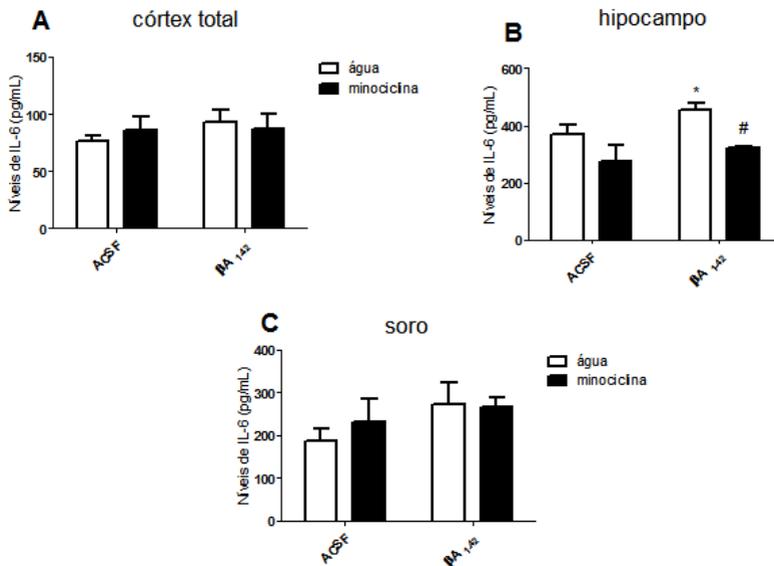
**Figura 10:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de IL-1 $\beta$  em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com  $\beta$ A<sub>1-42</sub> i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura **A** mostra os níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) no córtex total; **B** mostra os níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) no hipocampo e a figura **C** no soro. A figura **D** mostra a correlação positiva entre os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo e os erros totais para encontrar a recompensa no teste de labirinto octogonal. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \*p <0,05 em quando comparado com o grupo de ACSF + água e #p <0,05 quando comparado com o grupo  $\beta$ A<sub>1-42</sub> + água.

Os níveis de TNF- $\alpha$  estão ilustrados na figura 11. Houve um aumento de TNF- $\alpha$  no córtex total [F (1,16) = 14,69; p<0,01] e hipocampo [F (1,16) = 6,44; p<0,05] no grupo que recebeu os oligômeros  $\beta A_{1-42}$  quando comparado ao controle; A minociclina foi capaz de prevenir este efeito no córtex total (p<0,01) (figura 11A) e no hipocampo (p<0,05) como mostrado na figura 11B. Não houve diferença estatística no soro (figura 11C). Ainda, no córtex total, houve correlação positiva (r = 0,26; p<0,01) entre os níveis de TNF- $\alpha$  e os erros totais para encontrar a recompensa no labirinto octogonal (figura 11D), correlacionando a neuroinflamação e comprometimento da memória.



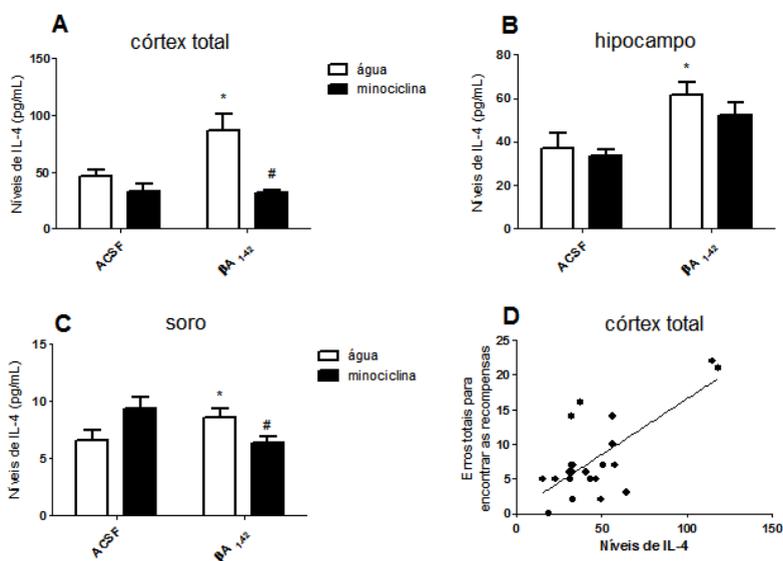
**Figura 11:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de TNF- $\alpha$  em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura **A** mostra os níveis de TNF- $\alpha$  (pg/mL) no córtex total; **B** mostra os níveis de TNF- $\alpha$  (pg/mL) no hipocampo e a figura **C** no soro. A figura **D** mostra a correlação positiva entre os níveis de TNF- $\alpha$  no córtex total e os erros totais para encontrar a recompensa no teste de labirinto octogonal. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \*p < 0,05 em quando comparado com o grupo de ACSF + água e #p < 0,05 quando comparado com o grupo  $\beta A_{1-42}$  + água.

Não houve alteração nos níveis de IL-6 no córtex total ( $p=0,56$ ) (figura 12A), nem no soro ( $p=0,53$ ) (figura 12C), em nenhum dos grupos experimentais, apenas no hipocampo [F (1,16) =13,43;  $p<0,01$ ] (figura 12B). Os animais submetidos ao modelo de DA apresentaram um aumento de IL-6 ( $p<0,05$ ) e a minociclina foi capaz de prevenir esse aumento ( $p<0,05$ ). Porém, não foi observado correlação entre os níveis de IL-6 e o teste comportamental no labirinto octogonal.



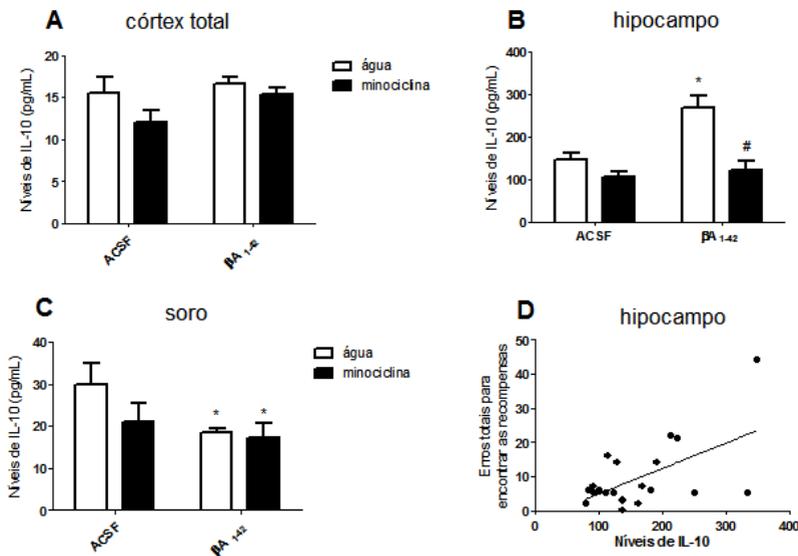
**Figura 12:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de IL-6 em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura A mostra os níveis de IL-6 (pg/mL) no córtex total; B mostra os níveis de IL-6 (pg/mL) no hipocampo e a figura C no soro. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \* $p < 0,05$  em quando comparado com o grupo de ACSF + água e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo  $\beta A_{1-42}$  + água.

A Figura 13 mostra os níveis de IL-4. A minociclina reverteu o aumento dos níveis de IL-4 causado pela administração de  $\beta$ A no córtex total (figura 13A) [ $F(1,16) = 5,86$ ;  $p < 0,05$ ], e no soro (figura 13C) [ $F(1,16) = 9,64$ ;  $p < 0,01$ ], mas não foi capaz de prevenir o aumento no hipocampo (figura 13B) [ $F(1,16) = 0,35$ ;  $p = 0,56$ ], embora o modelo tenha causado aumento desta citocina ( $p < 0,01$ ). Além disso, houve uma correlação positiva ( $r = 0,50$ ;  $p < 0,001$ ) entre os níveis de IL-4 e erros totais para encontrar a recompensa no labirinto octogonal (figura 13D), correlacionando o aumento dessa citocina anti-inflamatória e o comprometimento da memória espacial.



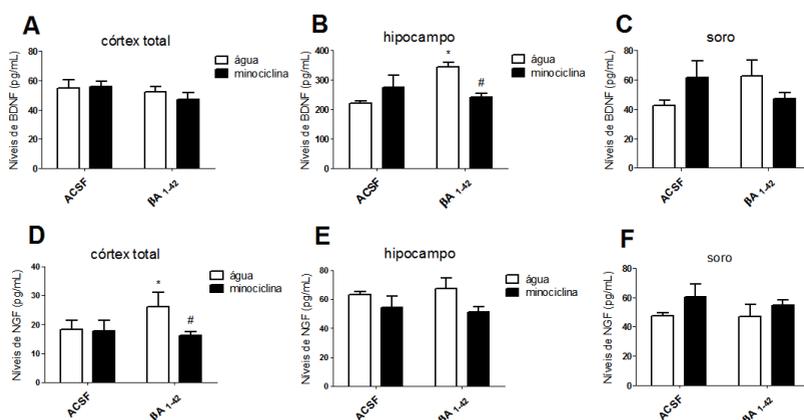
**Figura 13:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de IL-4 em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com  $\beta$ A<sub>1-42</sub> i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura A mostra os níveis de IL-4 (pg/mL) no córtex total; B mostra os níveis de IL-4 (pg/mL) no hipocampo e a figura C no soro. A figura D mostra a correlação positiva entre os níveis de IL-4 no córtex total e os erros totais para encontrar a recompensa no teste de labirinto octogonal. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \* $p < 0,05$  em quando comparado com o grupo de ACSF + água e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo  $\beta$ A<sub>1-42</sub> + água.

Não houve diferença estatística nos níveis de IL-10 entre os grupos no córtex total (figura 14A) [F (1,16) = 0,78; p = 0,39]. No hipocampo (figura 14B), observou-se um aumento nos níveis de IL-10 nos animais que receberam a administração de  $\beta A$  [F (1,16) = 5,59; p<0,05], quando comparado com o grupo controle e a minociclina reverteu esse aumento (p <0,01). No soro (figura 14C) a indução do modelo de DA reduziu os níveis de IL-10 quando comparados com o grupo controle [F (1,16) = 4,81; p<0,05], e a minociclina não conseguiu reverter essa redução. Houve uma correlação positiva (r = 0,32; p <0,01) entre os níveis de IL-10 observados no hipocampo e o número total de erros para encontrar a recompensa no teste de labirinto octogonal (figura 14D).



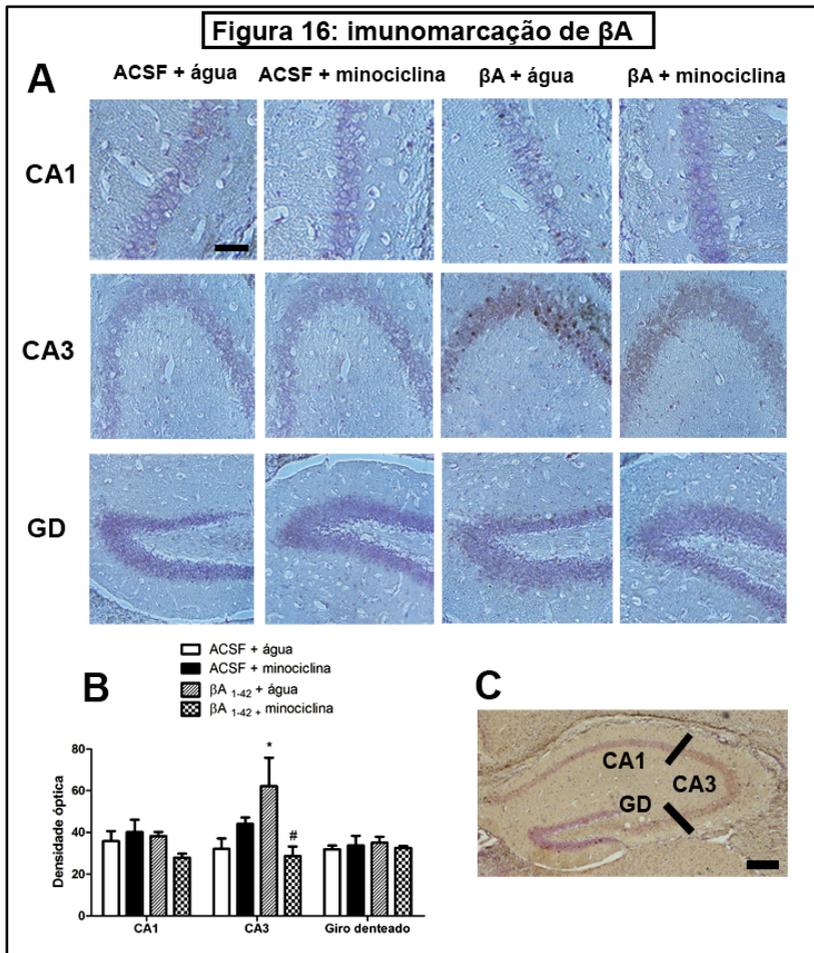
**Figura 14:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de IL-10 em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura **A** mostra os níveis de IL-10 (pg/mL) no córtex total; **B** mostra os níveis de IL-10 (pg/mL) no hipocampo e a figura **C** no soro. A figura **D** mostra a correlação positiva entre os níveis de IL-10 no hipocampo e os erros totais para encontrar a recompensa no teste de labirinto octogonal. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \*p <0,05 em quando comparado com o grupo de ACSF + água e #p <0,05 quando comparado com o grupo  $\beta A_{1-42}$  + água.

A figura 15 mostra os níveis de BDNF e NGF. A minociclina reverteu o aumento dos níveis de BDNF causado pela administração  $\beta A$  no hipocampo [F (1,16) = 11,53;  $p < 0,01$ ], (figura 15B). No córtex total (figura 15A) não houve diferença estatística entre os grupos [F (1,16) = 0,50;  $p = 0,49$ ], nem no soro (figura 15C) [F (1,16) = 4,61;  $p = 0,06$ ]. Em relação aos níveis de NGF, no córtex total (figura 16D) aumentaram devido a administração de  $\beta A$ , e esse aumento foi prevenido pelo tratamento com minociclina [F (1,16) = 5,39;  $p < 0,05$ ]. Não houve diferença estatística entre os grupos no hipocampo (figura 16E) [F (1,16) = 0,51;  $p = 0,48$ ], nem no soro (figura 16F) [F (1,13) = 0,17;  $p = 0,68$ ].



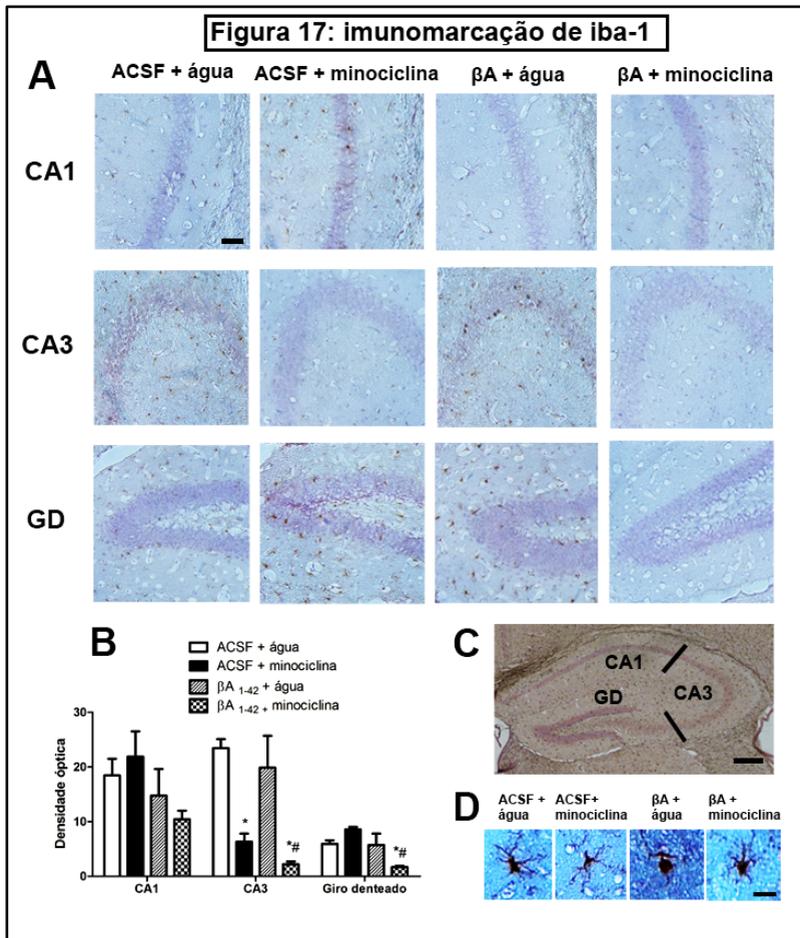
**Figura 15:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de BDNF e NGF em estruturas cerebrais e soro de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura A mostra os níveis de BDNF (pg/mL) no córtex total; B mostra os níveis de BDNF (pg/mL) no hipocampo e a figura C no soro. A figura D mostra os níveis de NGF no córtex total; E os níveis de NGF no hipocampo e F mostra os níveis de NGF no soro. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \* $p < 0,05$  em quando comparado com o grupo de ACSF + água e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo  $\beta A_{1-42}$  + água.

A figura 16 mostra os níveis de  $\beta A_{1-42}$  nas regiões do hipocampo CA1, CA3 e giro denteado avaliados por imuno-histoquímica. Na região CA1 não houve alteração nos níveis de  $\beta A_{1-42}$  [F (1,16) = 3,79; p= 0,06], na região CA3 houve aumento de  $\beta A_{1-42}$  nos animais induzidos ao modelo [F (1,16) = 7,82; p<0,05] e a minociclina reverteu esse aumento (p<0,05), e na região do giro denteado também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos [F (1,16) = 0,67; p= 0,41].



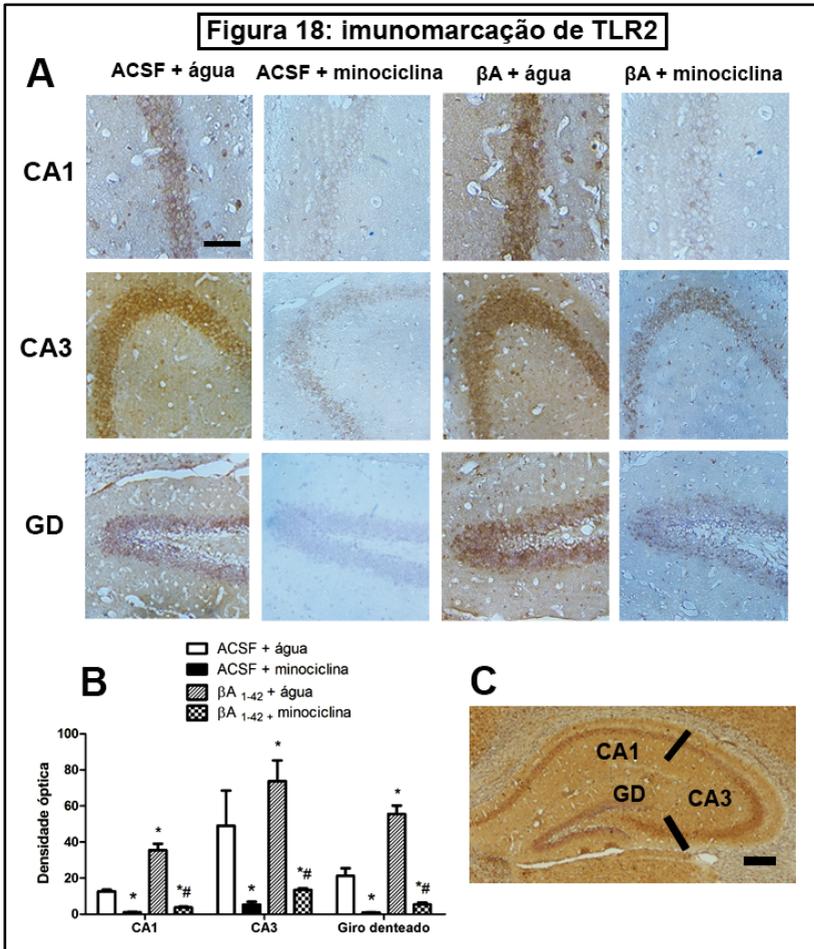
**Figura 16:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de  $\beta$ A nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo de camundongos Balb/c administrados com  $\beta$ A<sub>1-42</sub> i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Na figura **A** os painéis mostram as regiões do hipocampo imunomarcadas para  $\beta$ A nos quatro grupos experimentais avaliados, barra de escala = 100 $\mu$ m; **B** mostra a quantificação da densidade de marcação positiva para  $\beta$ A. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo de ACSF + água e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo  $\beta$ A<sub>1-42</sub> + água; e **C** mostra a localização no hipocampo das áreas adotadas para as imagens representativas, barra de escala = 500 $\mu$ m.

A figura 17 mostra a imunomarcção de iba-1, marcador microglial, no hipocampo. Na região CA1 não houve diferença entre os grupos [F (1,16) = 1,23; p= 0,27], na região CA3 a minociclina reduziu os nveis de imunomarcção de iba-1 quando comparado aos animais tambm submetidos ao modelo no tratados [F (1,16) = 6,83; p<0,01], e na região do giro denteado a minociclina reduziu a imunomarcção de iba-1 apenas nos animais submetidos ao modelo de demência [F (1,16) = 6,08; p<0,05].



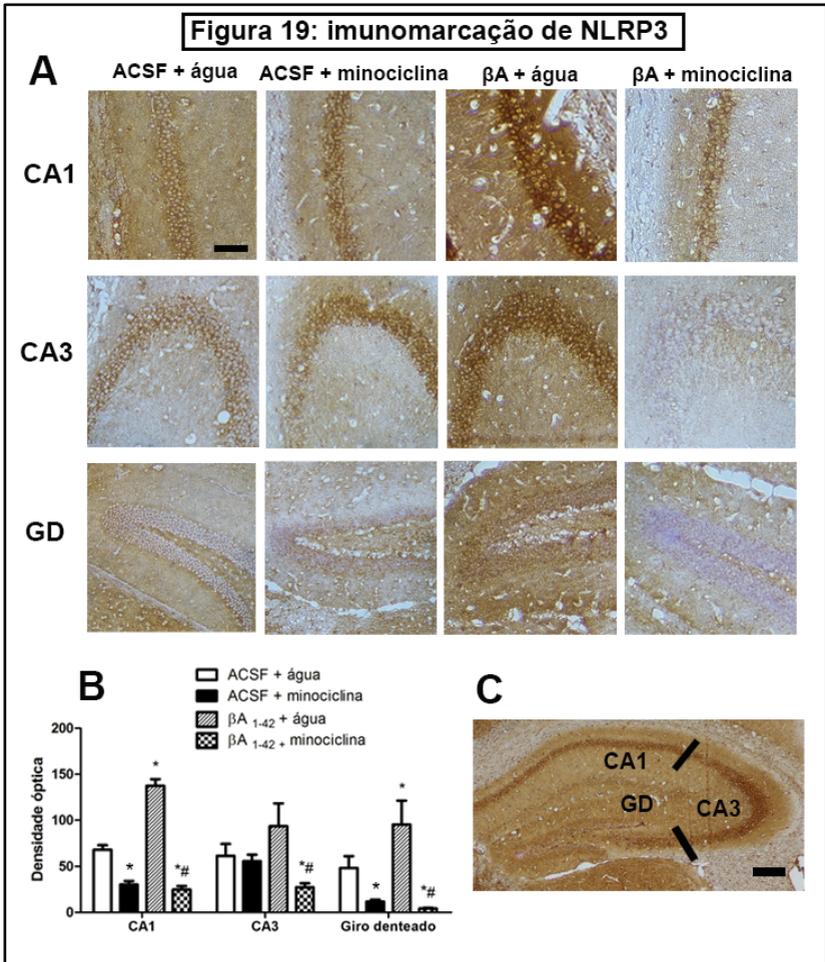
**Figura 17:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de iba-1 nas regiões CA1, CA3 e giro dentado (GD) do hipocampo de camundongos Balb/c administrados com  $\beta$ A<sub>1-42</sub> i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Na figura **A** os painéis mostram as regiões do hipocampo imunomarcadas para iba-1, barra de escala = 100 $\mu$ m; **B** mostra a quantificação da densidade de marcação positiva para iba-1. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \*p < 0,05 quando comparado com o grupo de ACSF + água e #p < 0,05 quando comparado com o grupo  $\beta$ A<sub>1-42</sub> + água; **C** mostra a localização no hipocampo das áreas adotadas para as imagens representativas, barra de escala = 500 $\mu$ m, e **D** mostra a morfologia detalhada da micróglia para observar as diferenças morfológicas da célula entre os grupos experimentais, barra de escala = 10 $\mu$ m.

A figura 18 mostra os níveis de TLR2. Na região CA1 houve interação entre o modelo e o tratamento [ $F(1,12) = 24,22$ ;  $p < 0,001$ ], sendo que o modelo de DA aumentou os níveis de TLR2 ( $p < 0,001$ ) e a minociclina reverteu esse aumento ( $p < 0,001$ ). Na região CA3 também foi observado interação [ $F(1,12) = 23,21$ ;  $p < 0,001$ ] e a minociclina reverteu o aumento de TLR2 ocasionado pelo modelo ( $p < 0,01$ ), e na região do giro denteado houve diferenças significativas [ $F(1,12) = 21,92$ ;  $p < 0,001$ ], já que a administração de  $\beta A_{1-42}$  causou aumento dos níveis de TLR2 ( $p < 0,001$ ) e a minociclina reverteu esse aumento ( $p < 0,001$ ).



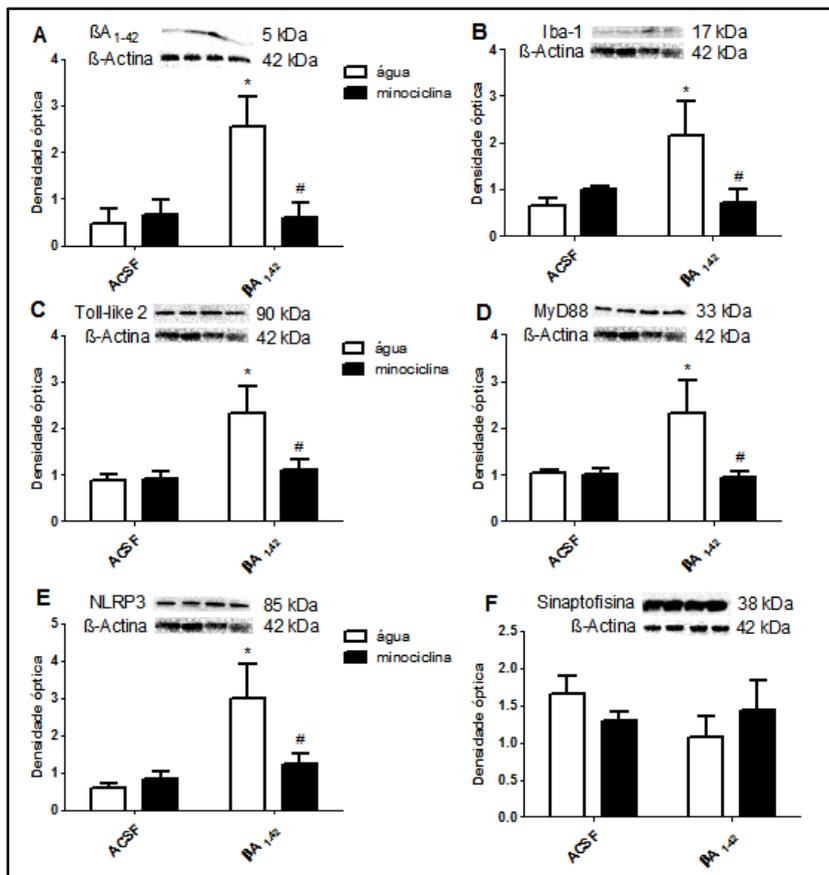
**Figura 18:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de TLR2 nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Na figura **A** os painéis mostram as regiões do hipocampo imunomarcadas para marcadas TLR2 nos quatro grupos experimentais avaliados, barra de escala = 100 $\mu$ m; **B** mostra a quantificação da densidade de marcação positiva para TLR2. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo de ACSF + água e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo  $\beta A_{1-42} + \text{água}$ ; e **C** mostra a localização no hipocampo das áreas adotadas para as imagens representativas, barra de escala = 500 $\mu$ m.

A figura 19 mostra os níveis de imunomarcção de NLRP3. Na região CA1 houve interação entre o modelo e o tratamento [ $F(1,12) = 52,51$ ;  $p < 0,001$ ], sendo que o modelo de DA aumentou os níveis de NLRP3 ( $p < 0,001$ ) e a minociclina reverteu esse aumento ( $p < 0,001$ ). Na região CA3 também foi observado diferença significativa entre os grupos [ $F(1,12) = 4,62$ ;  $p < 0,05$ ], porém, foi observado apenas o efeito da minociclina em reduzir os níveis de NLRP3 comparado com os animais controle ( $p < 0,05$ ) e comparado aos animais que receberam o  $\beta A_{1-42}$  ( $p < 0,05$ ). Na região do giro denteado houve interação [ $F(1,12) = 4,63$ ;  $p < 0,05$ ], já que a administração de  $\beta A_{1-42}$  causou aumento dos níveis de NLRP3 ( $p < 0,05$ ) e a minociclina reverteu esse efeito ( $p < 0,01$ ).



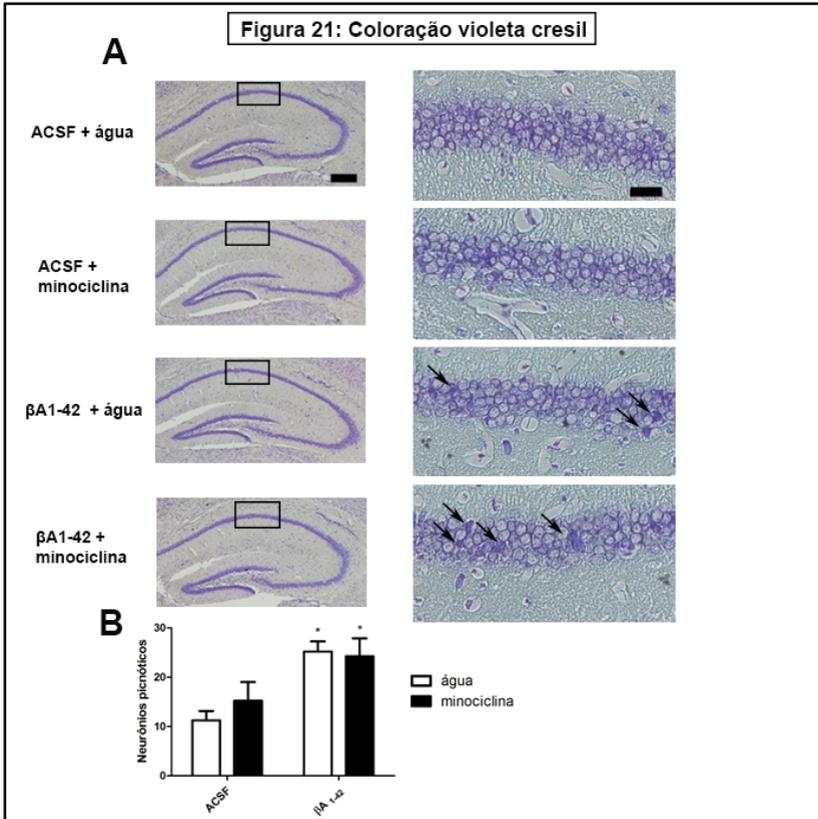
**Figura 19:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) nos níveis de NLRP3 nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Na figura **A** os painéis mostram as regiões do hipocampo imunomarcadas para NLRP3 nos quatro grupos experimentais avaliados, barra de escala = 100 $\mu$ m; **B** mostra a quantificação da densidade de marcação positiva para NLRP3. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo de ACSF + água e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo  $\beta A_{1-42}$  + água; e **C** mostra a localização no hipocampo das áreas adotadas para as imagens representativas, barra de escala = 500 $\mu$ m.

Os resultados de western blott no hipocampo estão ilustrados na figura 20. No hipocampo dos animais administrados com  $\beta$ A houve aumento de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> [F (1,12) = 6,56; p<0,05] e a minociclina reverteu esse aumento (p<0,05) (figura 20A). Foi observado também um aumento da imunorreatividade da micrógliia observado pela reatividade do marcador de células microgliais iba-1, o qual aumentou nos animais submetidos ao modelo de DA [F (1,12) = 5,78; p<0,05] e a minociclina reverteu esse efeito (p<0,05) (figura 20B). Toda a sinalização imune via TLR 2 aumentou nos animais administrados com  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, sendo observado aumento de TLR2 (figura 20C) [F (1,12) = 4,86; p<0,05], MyD88 (figura 20D) [F (1,12) = 4,80; p<0,05] e NLRP3 (figura 20E) [F (1,12) = 5,30; p<0,05] e a minociclina foi capaz de prevenir esse aumento de TLR2 (p<0,01), de MyD88 (p<0,05) e também de NLRP3 (p<0,05). Não foi observado alteração na expressão de sinaptofisina (figura 20F), marcador pré-sináptico, em nenhum dos grupos experimentais.



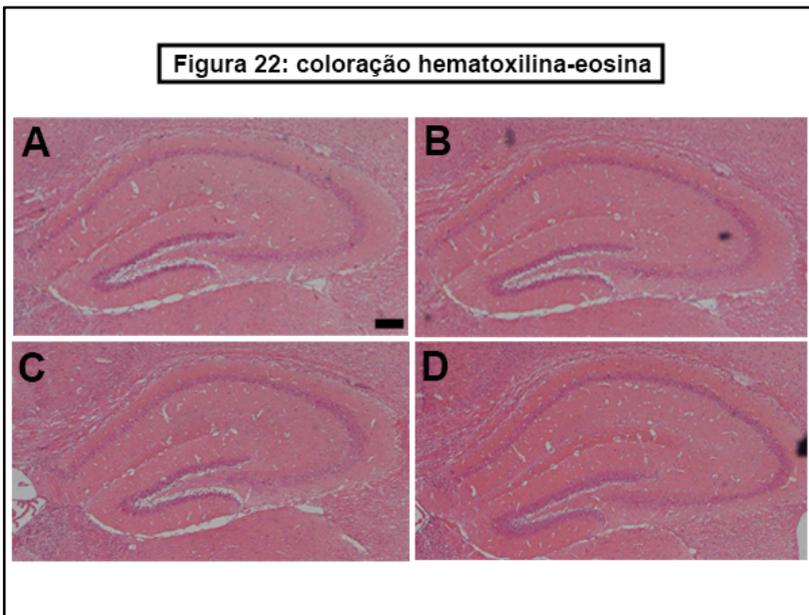
**Figura 20:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) na expressão de proteínas no hipocampo de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura **A** mostra o conteúdo de  $\beta A_{1-42}$ ; **B** mostra o conteúdo de Iba-1; **C** mostra o conteúdo de *toll-like* 2; **D** mostra o conteúdo de MyD88; **E** mostra o conteúdo de NLRP3 e **F** mostra o conteúdo proteico de sinaptofisina, todas no hipocampo. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média da razão entre a densidade óptica das respectivas proteínas dividida pela densidade óptica de  $\beta$ -actina, de 4 animais por grupo. \* $p < 0,05$  em quando comparado com o grupo de ACSF + água e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo  $\beta A_{1-42}$  + água.

Os resultados da coloração de Nissl (violeta cresil) estão representados na figura 21. Não houve interação entre o modelo e o tratamento [ $F(1,13) = 2,39$ ;  $p = 0,14$ ], uma vez que a minociclina não foi capaz de prevenir o aumento do número de neurônios picnóticos no hipocampo dos animais administrados com  $\beta A_{1-42}$  que estava aumentado tanto nos animais que receberam tratamento com água ( $p < 0,05$ ) quanto nos animais tratados com minociclina ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos animais controle.



**Figura 21:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) no número de neurônios picnóticos no hipocampo de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Na figura **A** os painéis da direita mostram o hipocampo corado com violeta cresil nos quatro grupos experimentais avaliados, e o retângulo mostra a região aproximada à direita, as flechas indicam os neurônios que foram considerados picnóticos, barra de escala = 500 $\mu$ m painéis à direita e 75 $\mu$ m painéis à esquerda; **B** mostra a quantificação de neurônios picnóticos encontrados no hipocampo bilateralmente. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \*p < 0,05 quando comparado com o grupo de ACSf + água.

A figura 22 mostra os hipocampos corados com a coloração de HE que é utilizada para visualizar possíveis mudanças morfológicas neuronais ou perda tecidual. No presente estudo não foi realizada contagem dos neurônios com alterações morfológicas por essa coloração, uma vez que a técnica de Nissl, observada na figura anterior, é mais sensível para detectar neurônios em processo de retração, atrofia ou cromatólise. Assim, foi utilizado a coloração de HE apenas para visualizar perda tecidual maciça ou redução de volume hipocampal, o que aparentemente não foi observado em nenhum dos grupos experimentais.



**Figura 22:** Efeito do tratamento com minociclina (50 mg/kg) no hipocampo de camundongos Balb/c administrados com  $\beta A_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Na figura mostra o hipocampo corado com hematoxilina-eosina, o painel **A** mostra o hipocampo representativo de um animal do grupo ACSF + água; **B** mostra um hipocampo de um animal do grupo ACSF + minociclina; **C** mostra um hipocampo do grupo  $\beta A_{1-42}$  + água; e **D** mostra um hipocampo do grupo  $\beta A_{1-42}$  + minociclina. Barra de escala = 500 $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

A principal característica da DA é a perda de memória. Esse declínio inicia-se de modo a ser confundido com o declínio cognitivo normal da idade avançada, porém, vai se agravando até tornar-se muito pronunciado. Assim, o diagnóstico da DA muitas vezes é tardio, e quando a doença é descoberta, já está em estágios bem avançados (Abbott, 2012). O declínio da memória episódica e semântica são nitidamente percebidos pelos pacientes e familiares, sendo que a memória semântica, de modo geral, refere-se ao conhecimento adquirido sobre o mundo, e a memória episódica, a capacidade de recordar episódios pessoais (Matthews, 2015).

A memória episódica envolve uma série de etapas, que incluem, codificação, consolidação e recuperação da memória. Para a codificação é necessário o processamento da informação através de mecanismos de atenção, enquanto a consolidação envolve o armazenamento desta informação e a recuperação refere-se ao ato de lembrar-se de tais informações no futuro (Matthews, 2015). Outro tipo de comprometimento de memória observável na DA é a memória de trabalho, a qual refere-se a reter temporariamente e utilizar uma informação para completar tarefas, como por exemplo decorar o número de um telefone para após discá-lo (Rabinovici et al., 2015).

Para avaliar esses tipos de memória citados em roedores, no presente estudo, foi utilizado o labirinto octogonal, já que, o animal precisa consolidar, armazenar e recordar em qual braço estava a recompensa, além de não retornar onde já consumiu a mesma (memória de trabalho) (Foyet et al., 2011; Hritcu et al., 2012). Outra característica do labirinto octogonal e também do labirinto em Y, é que ambos são testes que necessitam de orientação espacial para o animal completar a tarefa (Dellu et al., 1997). Já nos estágios iniciais da DA, os pacientes apresentam desorientação e comprometimento da memória visuoespacial, sendo um dos danos de memória mais evidentes, uma vez que o paciente ao sair na rua sozinho muitas vezes não consegue voltar para casa, e esse acaba sendo um sinal de alarme para o indivíduo e para os familiares buscarem o diagnóstico da doença (deIpolyi et al., 2007; Tu et al., 2015; Foxe et al., 2016)

Quando os sintomas cognitivos da DA estão mais evidentes, a deposição de  $\beta$ A, formação de NTFs e morte celular já estão proeminentes, dificultando o tratamento da doença (Hyman et al., 2012). Os primeiros estudos genéticos realizados nos anos 90 indicaram que as placas compostas por  $\beta$ A eram o principal fator causal da DA, isso

porque, as primeiras mutações observadas foram nos genes que codificam a APP e a PSEN1/PSEN2, que participam do processamento da APP e formação dos fragmentos  $\beta A$  (Schellenberg et al., 1992; Levy-Lahad et al., 1995). Essas descobertas foram base para a hipótese da cascata amiloide, e após essas descobertas, vários estudos clínicos correlacionaram o acúmulo de  $\beta A$  e a formação de placas senis com os danos cognitivos observados em pacientes com a DA (Sabbagh et al., 2010; Robinson et al., 2011; Donohue et al., 2014; Lim et al., 2015; Pietrzak et al., 2015; Sparacia et al., 2017).

No presente estudo, a administração de oligômeros  $\beta A$  foi capaz de causar danos de memória espacial, de trabalho e aversiva nos camundongos. O dano de memória espacial já havia sido demonstrado em outros estudos com roedores utilizando esse modelo de administração de  $\beta A_{1-42}$  (Poling et al., 2008; Ruiz-Muñoz et al., 2011; Prakash et al., 2013; Liu et al., 2015; Wang et al., 2016a). No entanto, vale destacar que esses danos de memória foram induzidos pelo  $\beta A_{1-42}$ , já que a “hipótese amiloide” está sendo cada vez mais contestada (Nelson et al., 2012; Karran e De Strooper, 2016), não ficando claro se o acúmulo de  $\beta A$  é uma causa, um marcador, ou apenas uma característica fisiopatológica da doença, especialmente após os testes de imunização contra  $\beta A_{1-42}$  em pacientes permanecerem inconclusivos (Zotova et al., 2013; Brody et al., 2016; Holmes et al., 2016).

No presente estudo a minociclina foi capaz de melhorar a memória espacial avaliada pelos testes de labirinto octogonal e em Y e a memória de trabalho dos animais submetidos ao modelo de demência do tipo DA. Outros estudos também avaliaram os efeitos da minociclina na memória espacial utilizando modelos animais de DA, e foi demonstrado que a minociclina reverteu danos de memória utilizando o teste de labirinto em Y (Biscaro et al., 2012) e o teste de labirinto aquático (Bruno et al., 2009; Parachikova et al., 2010). Porém, estes estudos utilizaram modelos de camundongos transgênicos para DA. Além disso, o tratamento com minociclina foi realizado durante 3 semanas via intraperitoneal e melhorou o dano de memória espacial avaliada pelo labirinto aquático também em ratos injetados i.c.v. com oligômeros  $\beta A_{1-42}$  (Choi et al., 2007). Outro estudo, porém, não encontrou reversão do dano de memória no labirinto aquático em camundongos transgênicos para APP após o tratamento durante 3 meses com minociclina, a qual foi adicionada à ração dos animais (Seabrook et al., 2006). No presente estudo, foi utilizado o teste de labirinto octogonal, assim, foi possível avaliar também a memória de trabalho dos animais, e mostrar o efeito protetor da minociclina, administrada durante 17 dias por via oral, sobre

esse tipo de memória. A redução da memória de trabalho é uma característica bem estabelecida em pacientes com DA (Kirova et al., 2015; Hill et al., 2017), sendo assim, o presente estudo mostrou um efeito inédito da minociclina administrada por via oral na cognição de animais no modelo de DA.

Para avaliar a memória aversiva em camundongos é utilizado o teste de esQUIVA inibitória, no qual os animais são submetidos a um estímulo aversivo em um determinado contexto ou ambiente. Esse teste é amplamente utilizado em modelos animais para avaliar estágios iniciais da DA, avaliando a memória e a codificação de experiências (Shrestha e Klann, 2016). No presente estudo, a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$  causou danos de memória imediata e também de longa duração avaliada pelo teste de esQUIVA inibitória, e o tratamento com minociclina foi capaz de prevenir esses danos. No estudo de Choi et al. (2007) também houve dano na memória de longa duração no teste de esQUIVA inibitória após a administração i.c.v. de oligômeros  $\beta A_{1-42}$  em ratos, o qual foi prevenido pelo tratamento com minociclina 45 mg/kg durante 3 semanas por via intraperitoneal. Em outro estudo, a minociclina adicionada a ração, durante 4 meses (dose aproximada 45 mg/kg/dia), também reverteu o dano de memória aversiva de curta e longa duração, porém, foi observado dano na memória de curta duração, diferente do presente estudo. O motivo desta diferença provavelmente foi porque estes autores utilizaram camundongos transgênicos para DA (Parachikova et al., 2010). Nenhum dos estudos citados avaliou a memória aversiva imediata. Mas no presente estudo observamos prejuízo neste tipo de memória em animais submetidos ao modelo de DA, e a minociclina foi efetiva em reverter esse dano.

A consolidação da memória aversiva, ou condicionamento contextual do medo, necessita da estimulação das células do córtex entorrinal e das células granulares do hipocampo. A formação das sinapses nestas regiões e consolidação da memória de longa duração envolve a LTP (Nabavi et al., 2014). O hipocampo e as estruturas corticais, estão associados ao processamento de memória e são as regiões mais afetadas pela DA (Ramos Bernardes da Silva Filho et al., 2017). Assim, essas foram as estruturas selecionadas para verificar os níveis de citocinas inflamatórias, visando relacionar a alteração desses mediadores com os danos ou proteção da memória observados no presente estudo. Avaliou-se também os níveis de neurotrofinas, e além disso, foi utilizado também o soro dos animais para as análises, como um parâmetro periférico.

A neuroinflamação está presente nos estágios iniciais assintomáticos e avançados da DA. Atualmente os estudos têm focado muito nessa característica fisiopatológica, principalmente, após a descoberta de polimorfismos em vários genes relacionadas com a resposta inflamatória e fagocitose em pacientes com DA (Lambert et al., 2013). A neuroinflamação está relacionada ao prejuízo cognitivo observado na doença, sendo que, estudos observaram a associação entre o declínio cognitivo e os níveis de mediadores inflamatórios no sangue e LCR de pacientes com DA (Solfrizzi et al., 2006; Harries et al., 2012; Westin et al., 2012), além do aumento de citocinas pró-inflamatórias no soro, cérebro e no LCR desses pacientes (Jack et al., 2013; Zhang et al., 2013b; Dursun et al., 2015).

Os fragmentos  $\beta A$  parecem ativar o sistema imune inato promovendo a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios que podem contribuir para disfunção, lesão e possivelmente, a morte neuronal (Ferretti et al., 2012). Uma das teorias das quais justifica a ativação de receptores da imunidade inata por  $\beta A$ , envolve enterobactérias que possuem componentes proteicos na sua matriz extracelular chamadas fibras curli. Essas fibras estão envolvidas na adesão das bactérias às superfícies e na formação de biofilme bacteriano. As mesmas são potentes indutores de resposta inflamatória no hospedeiro (Barnhart e Chapman, 2006). Estrutural e bioquimicamente, as fibras curli pertencem a uma classe conhecida como fibras amiloides, a mesma do  $\beta A_{1-42}$ . Essa semelhança estrutural pode fazer com que o sistema imune reconheça tão fortemente e igualmente esses fragmentos como nocivos ao organismo (Tukel et al., 2009; Tukel et al., 2010; Rapsinski et al., 2015).

No presente estudo foi possível observar que a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$  aumentou a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no córtex total e hipocampo, IL-1 $\beta$  no soro, e IL-6 no hipocampo dos camundongos e a minociclina reverteu o aumento dessas citocinas nos camundongos submetidos ao modelo de DA. No estudo de Hunter et al. (2004) a minociclina reduziu a transcrição de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no prosencéfalo basal de camundongos administrados com imunotoxina p75-saporina, que causa morte de neurônios colinérgicos. Outro estudo mostrou que a minociclina reduziu os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em cultura de células microgliais (Seabrook et al., 2006), e também reduziu os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  no cérebro de camundongos triplo transgênicos (3xTg-AD) (Parachikova et al., 2010). Além disso, reduziu o conteúdo de IL-1 $\beta$  no córtex de camundongos transgênicos, que estava aumentada mesmo antes do aparecimento das placas amiloides (Ferretti et al., 2012). Porém, é a primeira vez que os efeitos da minociclina sobre essas citocinas pró-

inflamatórias são mostrados no presente modelo de demência do tipo DA, confirmando que essas alterações foram provenientes da administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$  e que a minociclina foi capaz de prevenir esse efeito.

Além disso, houve uma correlação positiva entre os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo e os erros totais para encontrar as recompensas. Estes resultados mostram que houve uma correlação direta entre os níveis aumentados dessa citocina pró-inflamatória e o dano de memória espacial observado nos camundongos. A capacidade da IL-1 $\beta$  de inibir a LTP no hipocampo já é bem conhecida (Murray e Lynch, 1998; O'Donnell et al., 2000; Nolan et al., 2005; Tarr et al., 2011; Liu et al., 2012b). Também já foi demonstrado utilizando um modelo de camundongo transgênico que causa superexpressão de IL-1 $\beta$ , que o aumento dessa citocina causa danos na memória contextual e espacial de longa duração dependente do hipocampo (Hein et al., 2010), enquanto que o bloqueio dessa citocina melhora a memória espacial de camundongos transgênicos para DA (Kitazawa et al., 2011).

Já os níveis de TNF- $\alpha$  obtiveram uma correlação positiva com os erros totais para encontrar as recompensas apenas no córtex total. O córtex em roedores exerce uma variedade de funções, incluindo memória espacial, memória de trabalho, função executiva, tomada de decisões, planejamento e aprendizagem (Kesner e Churchwell, 2011). No presente estudo os níveis de TNF- $\alpha$  aumentaram cerca de 3 vezes mais no córtex total do que no hipocampo dos animais administrados com  $\beta A_{1-42}$ , esse fato pode justificar a correlação positiva com o dano de memória encontrada apenas nessa estrutura. Altas concentrações de TNF- $\alpha$  já foram associadas com pior função cognitiva em idosos (Sudheimer et al., 2014) e os níveis aumentados de TNF- $\alpha$  em no soro de pacientes com DA foram associados a um maior declínio cognitivo (Holmes et al., 2009) e também aumento dos sintomas neuropsiquiátricos (Holmes et al., 2011). Dessa forma, estão sendo realizados estudos clínicos utilizando inibidores de TNF- $\alpha$  em pacientes com DA, os quais estão mostrando bons resultados para retardar o declínio cognitivo (Butchart et al., 2015; Boris et al., 2017). Assim, um dos mecanismos pelo qual a minociclina melhorou a memória espacial dos camundongos no presente estudo foi provavelmente pela redução de IL-1 $\beta$  no hipocampo e TNF- $\alpha$  no córtex dos camundongos, já que estes mostraram estar diretamente relacionados ao dano de memória observado no estudo.

Além disso, foi observado no presente estudo, um aumento dos níveis de IL-4 no córtex total, hipocampo e soro, e IL-10 no hipocampo dos camundongos induzidos ao modelo. A minociclina também reverteu o aumento nos níveis de IL-4 causados pela administração de  $\beta A$  no

córtex total e no soro, mas não no hipocampo. A IL-4 possui uma série de propriedades anti-inflamatórias, como a inibição da produção de citocinas, tais como, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e inibição da proliferação de células gliais, além de aumentar a produção de IL-10 (Rubio-Perez e Morillas-Ruiz, 2012; Ul-Haq et al., 2016). A minociclina reverteu o aumento de IL-4 no córtex e soro, porém não no hipocampo. Possivelmente porque a inflamação ocasionada pelo  $\beta$ A foi mais pronunciada no hipocampo, uma vez que foi observado o aumento de IL-6 apenas nesta estrutura, necessitando talvez de uma resposta mais continuada de IL-4 para conter o aumento das citocinas inflamatórias. Porém, essa hipótese necessita ser confirmada com estudos adicionais. Por outro lado, houve uma correlação positiva entre os níveis de IL-4 no córtex total e os erros para encontrar as recompensas no teste de labirinto octogonal. Como mencionado anteriormente, o córtex em roedores é importante para função executiva e memória espacial (Kesner e Churchwell, 2011). Esse resultado parece contraditório já que a IL-4 é uma citocina anti-inflamatória, porém, na DA ela parece desempenhar outros papéis ainda não totalmente elucidados, uma vez que, a superexpressão de IL-4 no hipocampo de camundongos transgênicos para DA exacerbou a deposição de  $\beta$ A, e os autores sugerem que o aumento dessa citocina levou a supressão aguda dos mecanismos de depuração amiloide, contribuindo para a patologia (Chakrabarty et al., 2012). Além disso, altos níveis de IL-4 induziram a produção de CCL11 (do inglês, *C-C motif chemokine 11*) (Baruch et al., 2013), que é uma quimiocina associada com o déficit cognitivo em idosos e que se encontra aumentada no LCR de pessoas idosas (Villeda et al., 2011). Dessa forma, os autores mencionam esse efeito dúbio da IL-4 no aprendizado e na memória, destacando que o ideal para a neuroinflamação durante a senescência ou doenças neurodegenerativas seria a modulação da resposta imune (Baruch et al., 2013), já que esta desempenha papéis fisiológicos necessários para homeostase do cérebro (Levin e Godukhin, 2017).

A IL-10 é um potente supressor de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, limitando a inflamação e apoptose em células cerebrais (Lobo-Silva et al., 2016). No presente estudo a minociclina reverteu o aumento dos níveis de IL-10 no hipocampo ocasionado pela indução do modelo de DA. Além disso, os níveis dessa citocina foram positivamente relacionados com o dano de memória espacial. Tal como a IL-4, a IL-10 é conhecida por sua ação anti-inflamatória, e seu papel está cada vez mais implicado na DA. Uma recente metanálise mostrou uma forte associação entre os polimorfismos do gene da IL-10 e o risco de desenvolver a DA (Mun et al., 2016). Em amostras de hipocampo de cérebro *post mortem* de

pacientes com DA também foi encontrado aumento de IL-10. Dessa forma, os autores sugerem que a inibição da sinalização de IL-10 pode proteger contra danos cognitivos na DA, já que o mesmo estudo avaliou essa inibição em camundongos transgênicos e obteve resultados positivos contra danos de memória (Guillot-Sestier et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a IL-10 pode reduzir a fagocitose de  $\beta$ A pela micróglia ocasionando um efeito pró-amiloidogênico em camundongos (Chakrabarty et al., 2015). Portanto, fica claro novamente o quão difícil é modular a resposta imune na DA, uma vez que, essa resposta pode ser benéfica, aumentando a limpeza de fragmentos amiloides, evitando a formação de placas senis e a exacerbação da resposta imune, porém, quando se torna crônica essa neuroinflamação tem efeitos deletérios ao cérebro.

A neuroinflamação também pode influenciar o conteúdo encefálico dos fatores neurotróficos. Os fatores neurotróficos são pequenas proteínas responsáveis pela diferenciação, sobrevivência e morfologia neuronal, desempenhando papéis fundamentais na cognição e na formação da memória (Popova et al., 2017). Estudos sobre o papel das neurotrofinas na DA tendem a concentrar-se principalmente no papel do NGF e BDNF, e no seu efeito na manutenção da plasticidade sináptica do hipocampo e córtex cerebral (Allen et al., 2011). No presente estudo, a administração de  $\beta$ A causou um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo, mas não foi encontrada alteração no soro. Já foi descrito na literatura diminuição dos níveis de BDNF no soro de pacientes com DA (Gezen-Ak et al., 2013), porém outros estudos observaram aumento (Angelucci et al., 2010; Faria et al., 2014) ou não encontraram alterações (O'Bryant et al., 2009; O'Bryant et al., 2011a). Apesar de alguns estudos mostrarem redução de BDNF no hipocampo de camundongos transgênicos (Wang et al., 2017a) e injetados com  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (Wang et al., 2016b), outros não encontraram alterações nos níveis dessa neurotrofina no hipocampo de animais transgênicos (Nunes et al., 2015; Stuart et al., 2017).

A alteração nos níveis de BDNF parece depender do estágio da DA. No estudo de Laske et al. (2006) foi observado aumento dos níveis de BDNF no soro de pacientes com DA nos estágios iniciais da doença e redução nos estágios mais avançados quando comparado a indivíduos saudáveis, e o mesmo resultado foi encontrado em uma recente meta-análise (Kim et al., 2016). Estudos também encontraram uma associação negativa entre os níveis séricos de BDNF e o desempenho cognitivo em pacientes com DA (O'Bryant et al., 2011b). O estudo de O'Bryant et al. (2011a) concorda com a teoria de que o aumento dos níveis de BDNF

pode ser um mecanismo compensatório em resposta ao declínio cognitivo inicial da DA, como proposto por outros autores (Laske et al., 2006; Angelucci et al., 2010; Faria et al., 2014; Budni et al., 2015a).

O aumento de BDNF parece estar diretamente relacionado com a ativação de células microgliciais por  $\beta A$ , já que foi observado um aumento de BDNF expresso por células microgliciais perto de placas  $\beta A$  em camundongos transgênicos para DA (Burbach et al., 2004), e *in vitro* astrócitos ativados expressaram altos níveis de BDNF 3 horas após a exposição ao  $\beta A_{1-42}$  (Kimura et al., 2006). Esse aumento de BDNF parece estar relacionado a um mecanismo de defesa das células gliais contra a neurotoxicidade induzida pelo  $\beta A$  (Durand et al., 2017). Outros estudos também relacionaram o aumento de BDNF com a neuroinflamação, já que a sinalização de TNF- $\alpha$  e IL-6 aumentam a produção de BDNF em monócitos de sangue periférico humano (Schulte-Herbruggen et al., 2005). O mesmo foi observado no presente estudo, o qual a administração de  $\beta A_{1-42}$  causou aumento de citocinas e de BDNF e o tratamento com minociclina restabeleceu a neuroinflamação juntamente com a normalização destes níveis.

Houve também um aumento nos níveis de NGF no córtex total dos animais administrados com o  $\beta A_{1-42}$ . O NGF é secretado a partir de neurônios corticais na forma de uma molécula precursora, o pró-NGF. Indivíduos com DA apresentam um acúmulo de pró-NGF no córtex cerebral (Maria Florencia et al., 2016). O NGF maduro liga-se principalmente ao receptor tropomiosina quinase A (TrkA), que estimula as vias de transdução de sinal de sobrevivência, enquanto o pró-NGF se liga ao receptor da neurotrofina p75 que tem múltiplas funções incluindo ação pró-apoptótica (Mufson et al., 2012). Os níveis de pró-NGF são significativamente elevados no córtex frontal e entorrinal (Pedraza et al., 2005; Podlesniy et al., 2006), córtex parietal (Peng et al., 2004) e líquido cefalorraquidiano de pacientes com DA (Blasko et al., 2006). No córtex cerebral de pacientes com DA foi encontrado um déficit na cascata responsável pela conversão de pró-NGF em NGF maduro (Bruno et al., 2009). Esse mesmo estudo avaliou o efeito da minociclina em camundongos transgênicos para DA e observou que o tratamento reverteu o aumento de pró-NGF nesses animais (Bruno et al., 2009). No presente estudo, o tratamento com minociclina reverteu o aumento dos níveis de NGF, no entanto, estes resultados foram realizados por imunoensaio enzimático, detectando ambas as formas de NFG, a pró (imatura) e a madura, que são indistinguíveis quando avaliados por esta metodologia imunológica. Um estudo também encontrou redução dos níveis corticais de TrkA e isso foi correlacionado com o dano cognitivo em

pacientes com DA (Counts et al., 2004). Isso reforça a necessidade de investigação sobre alvos terapêuticos para a DA que envolvam a sinalização de NGF (Tuszynski et al., 2015).

Esses estudos vêm de encontro aos resultados do presente estudo, no qual o modelo de demência do tipo DA causou danos cognitivos semelhantes a DA em estágios iniciais, causando redução do desempenho dos animais nos testes de memória, além de aumento de citocinas e alteração nos níveis de neurotrofinas. Essas alterações foram prevenidas pelo tratamento com minociclina, mostrando que, o restabelecimento dos níveis de neurotrofinas e redução da neuroinflamação possam ser mecanismos chave na ação que esse fármaco exerce na memória.

Dessa forma, para tentar elucidar quais proteínas estão envolvidas no mecanismo neuroprotetor da minociclina contra oligômeros  $\beta A_{1-42}$  o presente estudo investigou uma via de sinalização relacionada à inflamação que envolve a sinalização mediada por TLR2 e o inflamassoma NLRP3. Essa via está em evidência nos últimos anos, sendo alvo de estudos de grande relevância sobre neuroinflamação (Heneka et al., 2013; He et al., 2016; Liston e Masters, 2017; Wang et al., 2017b). Para avaliar essas proteínas, foi selecionado o hipocampo, já que essa é a estrutura mais relacionada com a formação da memória e é a região mais afetada na DA (Hirjak et al., 2017), sendo a principal estrutura associada ao dano de memória espacial observado na doença (Booth et al., 2016). Além disso, o hipocampo foi a estrutura que mais apresentou alteração nos níveis de citocinas analisadas no presente estudo, sendo que houve uma correlação positiva entre os níveis de IL-1 $\beta$  e o comprometimento de memória espacial, sendo que, a montagem do inflamassoma NLRP3 é diretamente relacionada a liberação de IL-1 $\beta$  para o meio extracelular (Kim et al., 2017) e com a amplificação da resposta imune.

No presente estudo o tratamento com minociclina foi capaz de reduzir os níveis de  $\beta A$  no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo. Isso foi demonstrado por imuno-histoquímica, ficando bem evidente na região CA3 do hipocampo e foi confirmado pela técnica de western blot. Provavelmente esse efeito se deve à inibição da resposta inflamatória e ativação de NLRP3, ocasionada pela minociclina, já que como observado no estudo de (Heneka et al., 2013), a inibição de NLRP3 leva a um aumento na fagocitose de espécies  $\beta A$ .

O efeito da minociclina na redução dos níveis de  $\beta A$  já havia sido observado em outros estudos. Em um modelo de resistência à insulina pela administração de estreptozotocina, a minociclina reduziu os níveis de  $\beta A_{1-40}$  e  $\beta A_{1-42}$  no hipocampo de ratos (Cai et al., 2013). No estudo de

Parachikova et al. (2010) a minociclina reduziu apenas o  $\beta A_{1-40}$ , mas não o  $\beta A_{1-42}$  no homogenato de cérebro total de camundongos transgênicos. Em outro estudo utilizando camundongos transgênicos a minociclina também reduziu fragmentos  $\beta A$  no córtex (Ferretti et al., 2012). Porém, Biscaro et al. (2012) não encontraram diferenças nos níveis de  $\beta A$  entre animais transgênicos tratados com minociclina no córtex dos animais. E em um estudo mais controverso foi visto que a minociclina aumentou as placas amiloides no hipocampo de camundongos transgênicos. Os autores relacionam esse aumento de placas senis a um mecanismo de captura das formas oligoméricas do peptídeo que seriam mais tóxicas (Seabrook et al., 2006), teoria essa, suportada pelo estudo de (Walsh e Selkoe, 2004). De qualquer forma, o presente estudo é o primeiro a verificar que a minociclina reduz  $\beta A$  no hipocampo de camundongos em modelo de DA induzido pela administração de  $\beta A_{1-42}$ .

Quando a micróglia está muito reativa perde sua capacidade de fagocitose (Wang et al., 2015b), entrando em um estado de liberação excessiva de mediadores inflamatórios, alterando inclusive sua morfologia (Heneka et al., 2014). No presente estudo foi possível observar este efeito, uma vez que houve redução do conteúdo de iba-1 nos animais tratados com minociclina, quando comparado aos animais não tratados. A técnica de imuno-histoquímica, apesar de não ter sido sensível o suficiente para mostrar o aumento de iba-1 nos animais após a administração de  $\beta A_{1-42}$ , deixou evidente a diferença morfológica da micróglia após a exposição ao  $\beta A_{1-42}$ , a qual possuía uma morfologia chamada “ameboide”, com retração e perda de suas ramificações. Porém, após o tratamento com minociclina, a micróglia voltou a sua forma fenotípica de repouso, provavelmente retornando a sua atividade fagocitária.

Contudo, na ausência de insultos patológicos, as micróglia "em repouso" ou “não ativadas”, não estão de forma alguma adormecidas. As micróglia em repouso são altamente dinâmicas, estendendo e retraindo os seus processos e intercalando com breves períodos estáticos (Nimmerjahn et al., 2005). Quando a micróglia está sendo ativada continuamente, além de causar danos inflamatórios ao cérebro, ocorre ainda redução da plasticidade neuronal, já que a motilidade de repouso dos processos microgliais se difunde no espaço extracelular, fazendo conexões diretas com elementos pré-sinápticos e pós-sinápticos (Wake et al., 2009). Além disso, sabe-se que as células microgliais participam ativamente nas sinapses (von Bernhardi et al., 2016). Assim, o restabelecimento do fenótipo bem ramificado da micróglia após o tratamento com minociclina observado no presente estudo é uma

importante consideração, podendo também estar relacionado à melhora da memória, além do possível aumento da fagocitose dos fragmentos  $\beta A_{1-42}$ .

42.

O desencadeamento da neuroinflamação observado na DA parece ser mediado pela ativação de receptores TLR por espécies  $\beta A$  (Tursi e Lee, 2017). Os TLRs são proteínas transmembranares classificadas de 1 a 13 (TLRs 1-13) expressas em diferentes tipos de células (Shirjang et al., 2017). O TLR2 parece estar mais relacionado com a ativação induzida por amiloide e ativação de NLRP3 (Rapsinski et al., 2015). No cérebro os receptores TLR2 são expressos em micróglias, astrócitos e neurônios (Zhao et al., 2017). A proteína MyD88 é um adaptador essencial na sinalização do TLR2, sendo responsável pela transdução do sinal e ativação de NF- $\kappa$ B, responsável pela transcrição e posterior expressão das citocinas inflamatórias (Gao et al., 2017). Foi observado no presente estudo que após a administração de  $\beta A_{1-42}$  houve um grande aumento da imunomarcagem de TLR2 nas três regiões do hipocampo analisadas e isso foi confirmado por western blot, que mostrou inclusive aumento de MyD88 nos animais que receberam  $\beta A_{1-42}$ , mostrando a ativação desse receptor ocasionada pelos oligômeros.

Como mencionado anteriormente a ativação de TLRs por espécies  $\beta A$ , ocorre possivelmente pela semelhança de componentes proteicos, que são chamadas fibras curli, presentes na matriz extracelular de enterobactérias, como *Escherichia coli* e *Salmonella entérica*. Essas fibras, são fibras amiloides, fortemente reconhecidas pelos receptores TLR2 (Rapsinski et al., 2015). Em um estudo *post mortem* foi encontrado muitas células positivas para TLR2 em torno das placas amiloides no córtex de pacientes com DA, além do aumento da transcrição e expressão de TLR2 no córtex de camundongos transgênicos para DA, realizado no mesmo estudo (Letiembre et al., 2009). O TLR2 parece mesmo ter papel central na toxicidade do  $\beta A_{1-42}$ , já que em camundongos nocaute para TLR2 não houve ativação microglial após a administração de  $\beta A_{1-42}$  (Jana et al., 2008). O mesmo foi observado em camundongos transgênicos para DA (Liu et al., 2012a), e em cultura de células neuronais de camundongos, em que o  $\beta A_{1-42}$  induziu liberação de mediadores inflamatórios, porém quando incubado com inibidor de TLR2 houve uma redução desses mediadores (Lin et al., 2013c). Além disso, vários polimorfismos nos genes de TLR2 já foram associados ao aumento do risco para o desenvolvimento da DA (Wang et al., 2011; Sohrabifar et al., 2015; Rezazadeh et al., 2016). Com isso, a importância de TLR2 na doença já está bem estabelecida na literatura.

No presente estudo o tratamento com minociclina foi capaz de reduzir a expressão de TLR2 nas três regiões analisadas por imunohistoquímica, e no homogenato de hipocampo, reverteu também o aumento de MyD88 nos camundongos após a administração de  $\beta A_{1-42}$ . Em cultura de células microgliais e astrocitárias de ratos expostas a LPS, a minociclina não reduziu a expressão de TLR2 (Piotrowska et al., 2017). Porém, em concordância com o presente estudo, foi observado que em camundongos submetidos a injeção de LPS e tratados com minociclina (50mg/kg i.p) durante três dias, houve um aumento da expressão de TLR2 pelo LPS e o tratamento com minociclina reverteu esse aumento em células microgliais (Henry et al., 2008). Assim como, no estudo de Hu et al. (2014), a minociclina reduziu os níveis de TLR2 avaliados por citometria de fluxo, em cultura de glioma, e de Kielian et al. (2007) a minociclina reduziu a expressão de TLR2 em células gliais num modelo de abscesso cerebral. Assim, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que a minociclina reduz a expressão de TLR2 induzida por  $\beta A_{1-42}$  em um modelo de animal de demência do tipo DA.

O inflamassoma NLRP3 é da classe de sensores citosólicos ou receptores que respondem a uma variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que são produzidos durante lesões teciduais (Freeman e Ting, 2016). As mutações genéticas do NLRP3, conduzem a várias doenças auto inflamatórias, tais como, síndrome de Muckle-Wells, doença inflamatória multissistêmica neonatal, síndrome autoinflamatória familiar ao frio, que são designadas como síndromes periódicas associadas à criopirina, nome pelo qual o inflamassoma NLRP3 também é conhecido (Broderick et al., 2015). Além disso, está intimamente relacionado ao desenvolvimento de gota (Chang et al., 2017), mostrando a importante função desta molécula na regulação da resposta inflamatória em humanos. A ativação do NLRP3 ocorre a nível periférico, em células mononucleares (Chang et al., 2017), e a nível central, em astrócitos, micróglia (Freeman et al., 2017) e neurônios (Yang et al., 2014).

Um dos primeiros estudos que relacionou o envolvimento do inflamassoma NLRP3 com a DA, observou que em cultura de células microgliais as fibrilas  $\beta A$  induziram a montagem do inflamassoma seguida da secreção de IL-1 $\beta$  (Halle et al., 2008). Neste mesmo estudo foi injetado  $\beta A$  nos camundongos nocaute para os genes da proteína ASC (necessária para montagem do inflamassoma) e caspase-1 (necessária para clivagem de IL-1 $\beta$  para forma madura) e foi observado uma diminuição significativa na ativação microglial e inflamação no cérebro destes camundongos. Outro estudo mostrou que camundongos

transgênicos APP e PS1, nocaute para NLRP3 apresentaram menos depósitos amiloides e melhora na fagocitose de  $\beta$ A quando comparado com os camundongos transgênicos sem o gene nocaute, e ainda mostrou aumento de caspase-1 no hipocampo de pacientes com DA leve e moderada (Heneka et al., 2013).

No presente estudo a administração de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> levou a um aumento da expressão da proteína NLRP3 no hipocampo dos camundongos, corroborando com a teoria de que o acúmulo de espécies  $\beta$ A levam a ativação do inflamassoma, provavelmente por uma falha na fagocitose que levaria ao rompimento do lisossomo e liberação de catepsina B (Codolo et al., 2013). Essa teoria estaria de acordo com o presente estudo, já que a região CA3 foi a única em que o aumento de  $\beta$ A persistiu, ou seja, em que a limpeza dos oligômeros não foi feita de forma eficiente após a administração. Também foi a única região do hipocampo em que não houve um aumento significativo de NLRP3.

A minociclina foi capaz de prevenir o aumento de NLRP3 nas três regiões do hipocampo avaliado por imuno-histoquímica e western blot. Em um estudo utilizando um modelo animal de nefropatia diabética, a minociclina foi capaz de reduzir a expressão de NLRP3 e a clivagem de IL-1 $\beta$  pela caspase-1 em células endoteliais glomerulares de ratos (Shahzad et al., 2016). O mesmo foi observado no cérebro de ratos em um modelo de hemorragia subaracnóide (Li et al., 2016). A minociclina também reduziu a expressão do inflamassoma na área de penumbra isquêmica em um modelo de isquemia cerebral em camundongos (Lu et al., 2016). Em outro estudo, a minociclina reduziu a expressão e transcrição de NLRP3 em células de retina de ratos induzidos a um modelo de retinopatia diabética (Chen et al., 2017). Esses recentes estudos são os únicos na literatura que relacionaram o efeito da minociclina à inibição do NLRP3. Ainda não há nenhum trabalho publicado sobre o efeito da minociclina na redução da expressão de NLRP3 em modelo animal de DA.

Em conjunto, os dados expostos no presente estudo mostram que a minociclina foi capaz de reduzir a neuroinflamação através da redução da ativação de TLR2 e MyD88, levando à redução da produção de citocinas inflamatórias, juntamente com a redução da ativação de NLRP3, o qual é responsável pela liberação da forma madura de IL-1 $\beta$  para o espaço extracelular, propagando a resposta inflamatória. A redução de  $\beta$ A ocasionada pelo tratamento com minociclina provavelmente também está relacionada à redução de TLR2, uma vez que, já foi demonstrado que a redução de TLR2 (Liu et al., 2012a), MyD88 (Hao et al., 2011) e NLRP3 (Heneka et al., 2013) melhora a fagocitose de espécies  $\beta$ A. Quando a

microglia está excessivamente ativada e liberando citocinas inflamatórias ocorre uma mudança morfológica na célula (retração das ramificações, aumento da soma), isso foi observado no presente estudo, e quando a microglia está com esse fenótipo ocorre a redução da fagocitose e essa mudança do estado microglial ocorre após a ativação de NLRP3 (Awad et al., 2017). Assim, os achados do presente estudo condizem com a hipótese de que a minociclina provoca também aumento da fagocitose de  $\beta A$ , porém, para confirmar essa hipótese seria necessário a investigação de moléculas responsáveis pela fagocitose, como por exemplo os receptores TREM2.

Para avaliar se a neuroinflamação observada ocasionou morte neuronal e o efeito da minociclina, foi quantificado o conteúdo de sinaptofisina, que é uma proteína encontrada nas vesículas sinápticas, funcionando como um marcador pré-sináptico. Avaliou-se o número de neurônios picnóticos (com núcleo fragmentado ou sem núcleo ou neurônios disformes) pela coloração de Nissl. Também se utilizou a coloração de HE, que permite a visualização do núcleo e do citoplasma do neurônio, corando os núcleos de azul e o citoplasma de rosa, permitindo visualizar alterações na morfologia dos neurônios. Não houve alteração nos níveis de sinaptofisina em nenhum dos grupos experimentais. É relatado que os níveis de sinaptofisina reduzem no cérebro de indivíduos com DA, e aumentam em indivíduos com comprometimento cognitivo leve sem demência ou em estágios iniciais de demência, o que pode ser um mecanismo compensatório, porém se torna indistinguível como um marcador para doenças neurodegenerativas (Head et al., 2009; Robinson et al., 2014). No presente estudo é difícil afirmar se não houve alteração por não haver perda sináptica, ou pelo estágio precoce que o modelo de demência, utilizado no presente estudo, mimetiza.

O modelo de demência utilizado no presente estudo parece condizer com um modelo de demência do tipo DA em estágios iniciais. Uma vez que é verificada a neuroinflamação, porém, não há formação de placas senis, e o dano de memória observável não é tão marcante. É interessante observar que, os animais que receberam a administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$  demonstraram algum aprendizado no teste de labirinto octogonal, já que reduziram a latência e os erros de memória para encontrara a recompensa ao longo dos dias, porém, não a partir do segundo dia, nem foram tão rápidos ou cometeram tão poucos erros quanto os animais controle ou tratados, e também não apresentaram dano na memória aversiva de curta duração. Além disso, quando observado o hipocampo com a coloração de HE não foi observada uma perda tecidual

maciça de células hipocampais, característica observada em estágios mais avançados da DA.

Porém, quando avaliada a coloração por Nissl foi observado um aumento no número de neurônios picnóticos, os quais apresentaram um volume reduzido, tornando-se hiperconcentrados e com a cromatina condensada, característico de apoptose, isso foi observado nas células hipocampais dos animais que receberam a administração de  $\beta A_{1-42}$ . No estudo de (Li et al., 2015) a administração de  $\beta A_{1-42}$  intrahipocampal em ratos também causou alterações características de apoptose no hipocampo. No presente estudo, o tratamento com minociclina não foi capaz de prevenir esse aumento de neurônios com características apoptóticas ou necróticas.

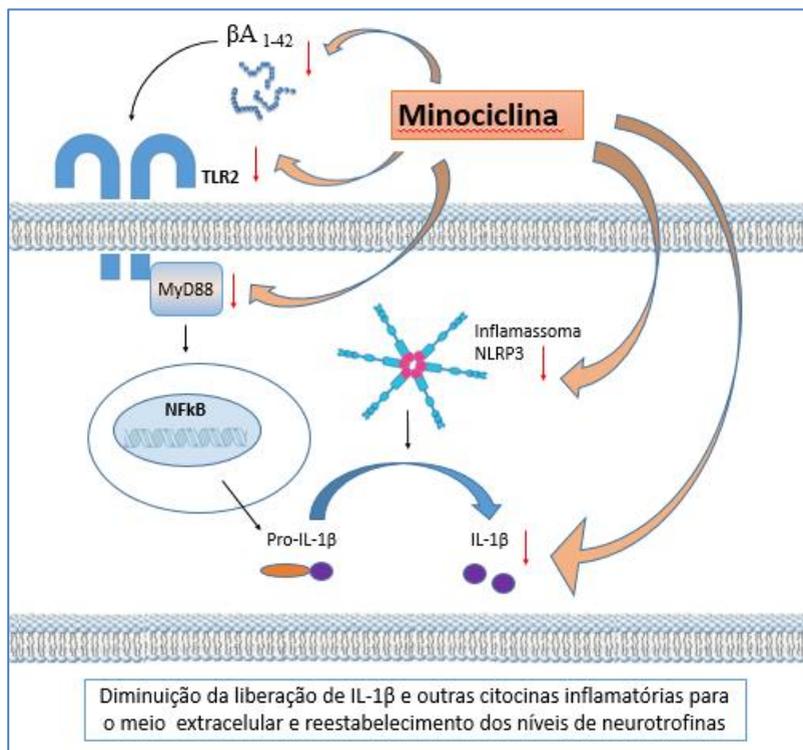
Contudo, em outros estudos, a minociclina já havia ocasionado proteção contra morte neuronal. A minociclina inibiu a apoptose e autofagia em um modelo de hemorragia cerebral em ratos (Wu et al., 2016), inibiu a liberação de citocromo c e também a apoptose em modelo de esclerose lateral amiotrófica em camundongos (Zhu et al., 2002), inibiu a protease associada à apoptose 1 (APAF-1) em modelo de Huntington *in vitro* e *in vivo* (Sancho et al., 2011). Enfim, muitos são os mecanismos pelos quais a minociclina mostrou inibir a morte celular, inclusive uma recente revisão sistemática numerou os vários mecanismos pelos quais a minociclina tem ação antiapoptótica (Haghi-Aminjan et al., 2017). Ainda, a prevenção contra morte neuronal causada pela minociclina também foi verificada em modelo animal de DA induzido pela administração de  $\beta A_{1-42}$  (Choi et al., 2007). Assim, o motivo pelo qual a minociclina não reverteu a apoptose no presente estudo não pode ser afirmada, mas pode ter sido em função da região do hipocampo analisada, ou a técnica e modo de análise utilizados. Mais estudos serão necessários para confirmar esses resultados.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o tratamento com minociclina foi capaz de reverter danos de memória aversiva e espacial causados pela administração de oligômeros  $\beta A_{1-42}$  em camundongos Balb/c, um modelo animal de demência do tipo DA. Um dos mecanismos pelo qual a minociclina reverteu contra danos de memória foi pela redução dos níveis de citocinas inflamatórias no córtex total, hipocampo e soro. Inclusive, os níveis de citocinas nas estruturas cerebrais foram correlacionados positivamente com os erros de memória espacial. Além disso, outro mecanismo que provavelmente contribuiu para melhora da memória dos animais, foi o restabelecimento dos níveis de neurotrofinas no córtex total e hipocampo após o tratamento com minociclina. Portanto, uma vez que a neuroinflamação é um mecanismo consistente na patologia da DA, os resultados reforçam os efeitos anti-inflamatórios da minociclina, bem como seus efeitos sobre a cognição e as neurotrofinas.

Foi verificado que a minociclina foi capaz de reduzir o nível de  $\beta A_{1-42}$ , reduzir a ativação microglial, e o conteúdo de TLR2, receptor que parece ser ativado por  $\beta A_{1-42}$ , uma vez que foi observado aumento deste no hipocampo dos camundongos injetados com oligômeros. A minociclina também reduziu os níveis de proteína MyD88, molécula adaptadora de receptores TLR2, responsável pela transdução do sinal do receptor. Essa redução da ativação de TLR2 parece ter sido responsável pela redução de citocinas ocasionada pelo tratamento. Para maturação de IL-1 $\beta$ , liberação desta para o meio extracelular e propagação da inflamação, é necessária a ativação do inflamassoma NLRP3. No presente estudo se pode verificar que houve um aumento do conteúdo de NLRP3 nos animais administrados com  $\beta A$  e a minociclina foi capaz de reverter esse aumento, levando a redução de IL-1 $\beta$  e outras citocinas inflamatórias. Esse mecanismo está resumido na figura 23.

A minociclina se mostrou uma alternativa terapêutica de relevante ação anti-inflamatória para DA, deixando grandes expectativas que estudos clínicos futuros confirmem os benefícios da minociclina para esta doença.



**Figura 23:** Mecanismos de ação da minociclina encontrados no presente estudo. A minociclina reduziu o conteúdo de  $\beta$ A, do receptor TLR2, da sua molécula adaptadora MyD88 e da proteína NLRP3 constituinte do inflamassoma, que é responsável pela clivagem e maturação de IL-1 $\beta$ . Além disso, reduziu os níveis de citocinas inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-10) em hipocampo, córtex total e soro e de BDNF e NGF em estruturas cerebrais. Do autor.

## PERSPECTIVAS

Alguns aspectos relacionados ao presente estudo podem ser melhor elucidados, desta forma propõe-se algumas perspectivas:

- Realizar a análise das mesmas proteínas de sinalização da via de inflamação também em outras estruturas cerebrais dos animais;
- Avaliar proteínas relacionadas a fagocitose de  $\beta$ A neste modelo de demência do tipo DA para confirmar se a minociclina aumenta a captação de  $\beta$ A pela micróglia;
- Utilizar outros testes para avaliar morte neuronal, como, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), lactato desidrogenase, ensaio de fluoro Jade B e método de TUNEL no modelo animal;
- Inibir o inflamassoma NLRP3 para verificar quais citocinas especificamente essa proteína foi responsável pelo aumento e se isso confere proteção contra danos de memória no modelo.

## REFERÊNCIAS

- Allen Institute [<http://mouse.brain-map.org/static/atlas>]. Allen Mouse Brain Atlas [updated 23/04/2017].
- 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2015;11(3):332-84.
- Abbott A. Cognition: The brain's decline. *Nature*. 2012;492(7427):S4-5.
- Adachi N, Numakawa T, Richards M, Nakajima S, Kunugi H. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases. *World journal of biological chemistry*. 2014;5(4):409-28.
- Angelucci F, Spalletta G, di Iulio F, Ciaramella A, Salani F, Colantoni L, Varsi AE, Gianni W, Sancesario G, Caltagirone C, Bossu P. Alzheimer's disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. *Current Alzheimer research*. 2010;7(1):15-20.
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in neurobiology*. 2002;68(3):209-45.
- Avila J, Wandosell F, Hernandez F. Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert review of neurotherapeutics*. 2010;10(5):703-10.
- Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnoy P, Piterboth W, Thomas L, Stankovic-Stojanovic K, Louvrier C, Giurgea I, Grateau G, Amselem S, Karabina SA. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. 2017;12(4):e0175336.
- Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. *Annual review of microbiology*. 2006;60:131-47.
- Barry AE, Klyubin I, Mc Donald JM, Mably AJ, Farrell MA, Scott M, Walsh DM, Rowan MJ. Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(20):7259-63.
- Baruch K, Ron-Harel N, Gal H, Deczkowska A, Shifrut E, Ndifon W, Mirilas-Neisberg N, Cardon M, Vaknin I, Cahalon L, Berkutzki T, Mattson MP, Gomez-Pinilla F, Friedman N, Schwartz M. CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(6):2264-9.

- Bell KF, Claudio Cuello A. Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology*. 2006;545(1):11-21.
- Belrose JC, Masoudi R, Michalski B, Fahnstock M. Increased pro-nerve growth factor and decreased brain-derived neurotrophic factor in non-Alzheimer's disease tauopathies. *Neurobiology of aging*. 2014;35(4):926-33.
- Biscaro B, Lindvall O, Tesco G, Ekdahl CT, Nitsch RM. Inhibition of microglial activation protects hippocampal neurogenesis and improves cognitive deficits in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Neuro-degenerative diseases*. 2012;9(4):187-98.
- Blasko I, Lederer W, Oberbauer H, Walch T, Kemmler G, Hinterhuber H, Marksteiner J, Humpel C. Measurement of thirteen biological markers in CSF of patients with Alzheimer's disease and other dementias. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2006;21(1):9-15.
- Bonelli RM, Hodl AK, Hofmann P, Kapfhammer HP. Neuroprotection in Huntington's disease: a 2-year study on minocycline. *International clinical psychopharmacology*. 2004;19(6):337-42.
- Booth CA, Ridler T, Murray TK, Ward MA, de Groot E, Goodfellow M, Phillips KG, Randall AD, Brown JT. Electrical and Network Neuronal Properties Are Preferentially Disrupted in Dorsal, But Not Ventral, Medial Entorhinal Cortex in a Mouse Model of Tauopathy. *The Journal of Neuroscience*. 2016;36(2):312-24.
- Boris D, Debomoy KL, Marwan NS. Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*. 2017;14(4):412-25.
- Borlikova GG, Trejo M, Mably AJ, Mc Donald JM, Sala Frigerio C, Regan CM, Murphy KJ, Masliah E, Walsh DM. Alzheimer brain-derived amyloid beta-protein impairs synaptic remodeling and memory consolidation. *Neurobiology of aging*. 2013;34(5):1315-27.
- Braak H, Braak E, Bohl J. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *European neurology*. 1993;33(6):403-8.
- Bretscher PA. On the Mechanism Determining the Th1/Th2 Phenotype of an Immune Response, and its Pertinence to Strategies for the Prevention, and Treatment, of Certain Infectious Diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2014;79(6):361-76.
- Britschgi M, Wyss-Coray T. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *International review of neurobiology*. 2007;82:205-33.
- Broderick L, De Nardo D, Franklin BS, Hoffman HM, Latz E. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annual review of pathology*. 2015;10:395-424.

- Brody M, Liu E, Di J, Lu M, Margolin RA, Werth JL, Booth K, Shadman A, Brashear HR, Novak G. A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Safety, Pharmacokinetics, and Biomarker Results of Subcutaneous Bapineuzumab in Patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD. 2016;54(4):1509-19.
- Bruno MA, Leon WC, Fragoso G, Mushynski WE, Almazan G, Cuello AC. Amyloid beta-induced nerve growth factor dysmetabolism in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2009;68(8):857-69.
- Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging and disease*. 2015a;6(5):331-41.
- Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging and disease*. 2015b;6(5):331-41.
- Budni J, Garcez ML, de Medeiros J, Cassaro E, Santos-Bellettini T, Mina F, Quevedo J. The anti-inflammatory role of minocycline in Alzheimer s Disease. *Current Alzheimer research*. 2016.
- Buoso E, Lanni C, Schettini G, Govoni S, Racchi M. beta-Amyloid precursor protein metabolism: focus on the functions and degradation of its intracellular domain. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2010;62(4):308-17.
- Burbach GJ, Hellweg R, Haas CA, Del Turco D, Deicke U, Abramowski D, Jucker M, Staufenbiel M, Deller T. Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(10):2421-30.
- Butchart J, Brook L, Hopkins V, Teeling J, Püntener U, Culliford D, Sharples R, Sharif S, McFarlane B, Raybould R, Thomas R, Passmore P, Perry VH, Holmes C. Etanercept in Alzheimer disease: A randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Neurology*. 2015;84(21):2161-8.
- Cacciatore I, Marinelli L, Fornasari E, Cerasa LS, Eusepi P, Türkez H, Pomilio C, Reale M, D'Angelo C, Costantini E, Di Stefano A. Novel NSAID-Derived Drugs for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(7):1035.
- Cai Z, Yan Y, Wang Y. Minocycline alleviates beta-amyloid protein and tau pathology via restraining neuroinflammation induced by diabetic metabolic disorder. *Clinical interventions in aging*. 2013;8:1089-95.

Cazarim Mde S, Moriguti JC, Ogunjimi AT, Pereira LR. Perspectives for treating Alzheimer's disease: a review on promising pharmacological substances. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 2016;134(4):342-54.

Chakrabarty P, Li A, Ceballos-Diaz C, Eddy JA, Funk CC, Moore B, DiNunno N, Rosario AM, Cruz PE, Verbeeck C, Sacino A, Nix S, Janus C, Price ND, Das P, Golde TE. IL-10 Alters Immunoproteostasis in APP mice, Increasing Plaque Burden and Worsening Cognitive Behavior. *Neuron*. 2015;85(3):519-33.

Chang WC, Jan Wu YJ, Chung WH, Lee YS, Chin SW, Chen TJ, Chang YS, Chen DY, Hung SI. Genetic variants of PPAR-gamma coactivator 1B augment NLRP3-mediated inflammation in gouty arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2017;56(3):457-66.

Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature medicine*. 2000;6(7):797-801.

Chen W, Zhao M, Zhao S, Lu Q, Ni L, Zou C, Lu L, Xu X, Guan H, Zheng Z, Qiu Q. Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2017;66(2):157-66.

Choi Y, Kim HS, Shin KY, Kim EM, Kim M, Kim HS, Park CH, Jeong YH, Yoo J, Lee JP, Chang KA, Kim S, Suh YH. Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2007;32(11):2393-404.

Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(5):387-98.

Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, de Bernard M. Triggering of Inflammasome by Aggregated  $\alpha$ -Synuclein, an Inflammatory Response in Synucleinopathies. *PloS one*. 2013;8(1):e55375.

Colovic M, Caccia S. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2003;791(1-2):337-43.

- Counts SE, Nadeem M, Wu J, Ginsberg SD, Saragovi HU, Mufson EJ. Reduction of cortical TrkA but not p75(NTR) protein in early-stage Alzheimer's disease. *Annals of neurology*. 2004;56(4):520-31.
- Cuello AC, Ferretti MT, Leon WC, Iulita MF, Melis T, Ducatenzeiler A, Bruno MA, Canneva F. Early-stage inflammation and experimental therapy in transgenic models of the Alzheimer-like amyloid pathology. *Neuro-degenerative diseases*. 2010;7(1-3):96-8.
- Cumming T, Brodtmann A. Dementia and stroke: the present and future epidemic. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2010;5(6):453-4.
- Cunha C, Gomes C, Vaz AR, Brites D. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. *Mediators of inflammation*. 2016;2016:6986175.
- Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(4):1156-63.
- Daniel Lee CY, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 2010;117(8):949-60.
- Daniels MJD, Rivers-Auty J, Schilling T, Spencer NG, Watremez W, Fasolino V, Booth SJ, White CS, Baldwin AG, Freeman S, Wong R, Latta C, Yu S, Jackson J, Fischer N, Koziel V, Pillot T, Bagnall J, Allan SM, Paszek P, Galea J, Harte MK, Eder C, Lawrence CB, Brough D. Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nature Communications*. 2016;7:12504.
- De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Sub-cellular biochemistry*. 2012;65:329-52.
- Deacon RM, Rawlins JN. T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols*. 2006;1(1):7-12.
- deIpoli AR, Rankin KP, Mucke L, Miller BL, Gorno-Tempini ML. Spatial cognition and the human navigation network in AD and MCI. *Neurology*. 2007;69(10):986-97.
- Dellu F, Fauchey V, Le Moal M, Simon H. Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiology of learning and memory*. 1997;67(2):112-20.
- Dhull DK, Bhateja D, Dhull RK, Padi SS. Differential role of cyclooxygenase isozymes on neuronal density in hippocampus CA1 region of intracerebroventricular streptozotocin treated rat brain. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2012;43(1):48-51.

Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(1):23-7.

Donohue MC, Sperling RA, Salmon DP, Rentz DM, Raman R, Thomas RG, Weiner M, Aisen PS. The preclinical Alzheimer cognitive composite: measuring amyloid-related decline. *JAMA neurology*. 2014;71(8):961-70.

Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, Broich K, Cavedo E, Crutch S, Dartigues J-F, Duyckaerts C, Epelbaum S, Frisoni GB, Gauthier S, Genthon R, Gouw AA, Habert M-O, Holtzman DM, Kivipelto M, Lista S, Molinuevo J-L, O'Bryant SE, Rabinovici GD, Rowe C, Salloway S, Schneider LS, Sperling R, Teichmann M, Carrillo MC, Cummings J, Jack Jr CR. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's & Dementia*. 2016;12(3):292-323.

Durand D, Carniglia L, Turati J, Ramírez D, Saba J, Caruso C, Lasaga M. Amyloid-beta neurotoxicity and clearance are both regulated by glial group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*. 2017.

Durazzo TC, Mattsson N, Weiner MW. Smoking and increased Alzheimer's disease risk: A review of potential mechanisms. *Alzheimer's & Dementia*. 2014;10(3, Supplement):S122-S45.

Dursun E, Gezen-Ak D, Hanagasi H, Bilgic B, Lohmann E, Ertan S, Atasoy IL, Alaylioglu M, Araz OS, Onal B, Gunduz A, Apaydin H, Kiziltan G, Ulutin T, Gurvit H, Yilmazer S. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology*. 2015;283:50-7.

Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2010;77(1):69-81.

Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(35):32687-95.

Evin G. Future Therapeutics in Alzheimer's Disease: Development Status of BACE Inhibitors. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2016;30(3):173-94.

Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in

- brain and is increased in Alzheimer's disease. *Molecular and cellular neurosciences*. 2001;18(2):210-20.
- Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. 2010;65(1):7-19.
- Faria MC, Goncalves GS, Rocha NP, Moraes EN, Bicalho MA, Gualberto Cintra MT, Jardim de Paula J, Jose Ravic de Miranda LF, Clayton de Souza Ferreira A, Teixeira AL, Gomes KB, Carvalho M, Sousa LP. Increased plasma levels of BDNF and inflammatory markers in Alzheimer's disease. *Journal of psychiatric research*. 2014;53:166-72.
- Ferreira D, Westman E, Eyjolfsdottir H, Almqvist P, Lind G, Linderöth B, Seiger A, Blennow K, Karami A, Darreh-Shori T, Wiberg M, Simmons A, Wahlund LO, Wahlberg L, Eriksdotter M. Brain changes in Alzheimer's disease patients with implanted encapsulated cells releasing nerve growth factor. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2015;43(3):1059-72.
- Ferreira ST, Clarke JR, Bomfim TR, De Felice FG. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2014;10(1, Supplement):S76-S83.
- Ferrera D, Mazzaro N, Canale C, Gasparini L. Resting microglia react to A $\beta$ 42 fibrils but do not detect oligomers or oligomer-induced neuronal damage. *Neurobiology of aging*. 2014;35(11):2444-57.
- Ferretti MT, Allard S, Partridge V, Ducatenzeiler A, Cuello AC. Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:62.
- Forloni G, Colombo L, Girola L, Tagliavini F, Salmona M. Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS letters*. 2001;487(3):404-7.
- Foxe D, Leyton CE, Hodges JR, Burrell JR, Irish M, Piguet O. The neural correlates of auditory and visuospatial span in logopenic progressive aphasia and Alzheimer's disease. *Cortex*. 2016;83:39-50.
- Foyet HS, Hritcu L, Ciobica A, Stefan M, Kamtchouing P, Cojocaru D. Methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;133(2):773-9.
- Freeman L, Guo H, David CN, Brickey WJ, Jha S, Ting JP-Y. NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 2017;214(5):1351-70.
- Freeman LC, Ting JPY. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *Journal of neurochemistry*. 2016;136:29-38.

Gao Q, Yin F, Zhang C, Yue Y, Sun P, Min M, Peng S, Shi Z, Lv J. Cloning, characterization, and function of MyD88 in silvery pomfret (*Pampus argenteus*) in response to bacterial challenge. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017.

Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Carneiro FG, Luz AP, Schiavo GL, Andrighetti MS, Scheid MG, Bolfe RP, Budni J. Minocycline reduces inflammatory parameters in the brain structures and serum and reverses memory impairment caused by the administration of amyloid beta (1-42) in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2017;77:23-31.

Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. *British journal of pharmacology*. 2013;169(2):337-52.

Garwood CJ, Cooper JD, Hanger DP, Noble W. Anti-inflammatory impact of minocycline in a mouse model of tauopathy. *Frontiers in psychiatry*. 2010;1:136.

Gezen-Ak D, Dursun E, Hanagasi H, Bilgic B, Lohman E, Araz OS, Atasoy IL, Alaylioglu M, Onal B, Gurvit H, Yilmazer S. BDNF, TNF $\alpha$ , HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2013;37(1):185-95.

Gomes GM, Dalmolin GD, Cordeiro MdN, Gomez MV, Ferreira J, Rubin MA. The selective A-type K<sup>+</sup> current blocker Tx3-1 isolated from the *Phoneutria nigriventer* venom enhances memory of naïve and A $\beta$ 25-35-treated mice. *Toxicon*. 2013;76:23-7.

Gordon PH, Moore DH, Gelinan DF, Qualls C, Meister ME, Werner J, Mendoza M, Mass J, Kushner G, Miller RG. Placebo-controlled phase I/II studies of minocycline in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2004;62(10):1845-7.

Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, Hilton JF, Spitalny GM, MacArthur RB, Mitsumoto H, Neville HE, Boylan K, Mozaffar T, Belsh JM, Ravits J, Bedlack RS, Graves MC, McCluskey LF, Barohn RJ, Tandan R. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet neurology*. 2007;6(12):1045-53.

Grimm MO, Mett J, Hartmann T. The Impact of Vitamin E and Other Fat-Soluble Vitamins on Alzheimer s Disease. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(11).

Group HS. Minocycline safety and tolerability in Huntington disease. *Neurology*. 2004;63(3):547-9.

- Group HS. A futility study of minocycline in Huntington's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2010;25(13):2219-24.
- Guillot-Sestier MV, Doty KR, Gate D, Rodriguez J, Jr., Leung BP, Rezai-Zadeh K, Town T. I110 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron*. 2015;85(3):534-48.
- Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(2):101-12.
- Haghi-Aminjan H, Asghari MH, Goharbari MH, Abdollahi M. A systematic review on potential mechanisms of minocycline in kidney diseases. *Pharmacological Reports*. 2017;69(4):602-9.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology*. 2008;9(8):857-65.
- Hao W, Liu Y, Liu S, Walter S, Grimm MO, Kiliaan AJ, Penke B, Hartmann T, Rube CE, Menger MD, Fassbender K. Myeloid differentiation factor 88-deficient bone marrow cells improve Alzheimer's disease-related symptoms and pathology. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 1):278-92.
- Harries LW, Bradley-Smith RM, Llewellyn DJ, Pilling LC, Fellows A, Henley W, Hernandez D, Guralnik JM, Bandinelli S, Singleton A, Ferrucci L, Melzer D. Leukocyte CCR2 expression is associated with mini-mental state examination score in older adults. *Rejuvenation research*. 2012;15(4):395-404.
- He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Nunez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*. 2016;530(7590):354-7.
- Head E, Corrada MM, Kahle-Wroblewski K, Kim RC, Sarsoza F, Goodus M, Kawas CH. Synaptic proteins, neuropathology and cognitive status in the oldest-old. *Neurobiology of aging*. 2009;30(7):1125-34.
- Hein AM, Stasko MR, Matousek SB, Scott-McKean JJ, Maier SF, Olschowka JA, Costa AC, O'Banion MK. Sustained hippocampal IL-1beta overexpression impairs contextual and spatial memory in transgenic mice. *Brain, behavior, and immunity*. 2010;24(2):243-53.
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(7):463-77.
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte

M, Latz E, Golenbock DT. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013;493(7434):674-8.

Henry CJ, Huang Y, Wynne A, Hanke M, Himler J, Bailey MT, Sheridan JF, Godbout JP. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *Journal of neuroinflammation*. 2008;5:15-.

Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2015;16(6):358-72.

Hernandez F, Lucas JJ, Avila J. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2013;33 Suppl 1:S141-4.

Hill NT, Mowszowski L, Naismith SL, Chadwick VL, Valenzuela M, Lampit A. Computerized Cognitive Training in Older Adults With Mild Cognitive Impairment or Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American journal of psychiatry*. 2017;174(4):329-40.

Hirjak D, Wolf RC, Remmele B, Seidl U, Thomann AK, Kubera KM, Schroder J, Maier-Hein KH, Thomann PA. Hippocampal formation alterations differently contribute to autobiographic memory deficits in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 2017.

Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JAR. Long-term effects of A $\beta$ 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *The Lancet*. 2016;372(9634):216-23.

Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology*. 2011;77(3):212-8.

Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D, Perry VH. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73(10):768-74.

Howard R, McShane R, Lindsay J, Ritchie C, Baldwin A, Barber R, Burns A, Dening T, Findlay D, Holmes C, Jones R, Jones R, McKeith I, Macharouthu A, O'Brien J, Sheehan B, Juszcak E, Katona C, Hills R, Knapp M, Ballard C, Brown RG, Banerjee S, Adams J, Johnson T, Bentham P, Phillips PP. Nursing home placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) trial: secondary and post-hoc analyses. *Lancet neurology*. 2015;14(12):1171-81.

- Hritcu L, Cioanca O, Hancianu M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(6):529-34.
- Hu F, Ku M-C, Markovic D, Dzaye ODa, Lehnardt S, Synowitz M, Wolf SA, Kettenmann H. Glioma associated microglial MMP9 expression is up regulated by TLR2 signalling and sensitive to minocycline. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014;135(11):2569-78.
- Hull M, Sadowsky C, Arai H, Le Prince Leterme G, Holstein A, Booth K, Peng Y, Yoshiyama T, Suzuki H, Ketter N, Liu E, Ryan JM. Long-Term Extensions of Randomized Vaccination Trials of ACC-001 and QS-21 in Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*. 2017.
- Hunter CL, Quintero EM, Gilstrap L, Bhat NR, Granholm AC. Minocycline protects basal forebrain cholinergic neurons from mu p75-saporin immunotoxic lesioning. *The European journal of neuroscience*. 2004;19(12):3305-16.
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2012;8(1):1-13.
- Investigators NN-P. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology*. 2006;66(5):664-71.
- Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Alonso AdC, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta neuropathologica*. 2009;118(1):53-69.
- Isaev NK, Stelmashook EV, Genrikhs EE. Role of Nerve Growth Factor in Plasticity of Forebrain Cholinergic Neurons. *Biochemistry Biokhimia*. 2017;82(3):291-300.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998;393(6686):635-6.
- Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Tracking pathophysiological

processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet neurology*. 2013;12(2):207-16.

Jack CR, Jr., Wiste HJ, Weigand SD, Knopman DS, Vemuri P, Mielke MM, Lowe V, Senjem ML, Gunter JL, Machulda MM, Gregg BE, Pankratz VS, Rocca WA, Petersen RC. Age, Sex, and APOE epsilon4 Effects on Memory, Brain Structure, and beta-Amyloid Across the Adult Life Span. *JAMA neurology*. 2015;72(5):511-9.

Jack CR, Jr., Wiste HJ, Weigand SD, Rocca WA, Knopman DS, Mielke MM, Lowe VJ, Senjem ML, Gunter JL, Preboske GM, Pankratz VS, Vemuri P, Petersen RC. Age-specific population frequencies of cerebral beta-amyloidosis and neurodegeneration among people with normal cognitive function aged 50-89 years: a cross-sectional study. *Lancet neurology*. 2014;13(10):997-1005.

Jana M, Palencia CA, Pahan K. Fibrillar Amyloid- $\beta$  Peptides Activate Microglia via TLR2: Implications for Alzheimer's Disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(10):7254-62.

Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of neurochemistry*. 2016.

Kesner RP, Churchwell JC. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of learning and memory*. 2011;96(3):417-31.

Kielian T, Esen N, Liu S, Phulwani NK, Syed MM, Phillips N, Nishina K, Cheung AL, Schwartzman JD, Ruhe JJ. Minocycline Modulates Neuroinflammation Independently of Its Antimicrobial Activity in Staphylococcus aureus-Induced Brain Abscess. *The American journal of pathology*. 2007;171(4):1199-214.

Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental neurology*. 2014;258:5-16.

Kim BY, Lee SH, Graham PL, Angelucci F, Lucia A, Pareja-Galeano H, Leyhe T, Turana Y, Lee IR, Yoon JH, Shin JI. Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: a Comprehensive Systematic Review and Meta-analysis. *Molecular neurobiology*. 2016.

Kim HJ, Moon WJ, Han SH. Differential cholinergic pathway involvement in Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2013;35(1):129-36.

Kim JK, Jin HS, Suh HW, Jo EK. Negative regulators and their mechanisms in NLRP3 inflammasome activation and signaling. *Immunology and cell biology*. 2017.

Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, Terao K. Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration. *Journal of neuroscience research*. 2006;84(4):782-9.

Kirova AM, Bays RB, Lagalwar S. Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *BioMed research international*. 2015;2015:748212.

Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto M, Koike M, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM. Blocking Interleukin-1 Signaling Rescues Cognition, Attenuates Tau Pathology, and Restores Neuronal  $\beta$ -Catenin Pathway Function in an Alzheimer's Disease Model. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;187(12):6539-49.

Kuang X, Scofield VL, Yan M, Stoica G, Liu N, Wong PK. Attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis by minocycline prevents retrovirus-induced neurodegeneration in mice. *Brain research*. 2009;1286:174-84.

Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thornton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin CF, Gerrish A, Schmidt H, Kunkle B, Dunstan ML, Ruiz A, Bihoreau MT, Choi SH, Reitz C, Pasquier F, Cruchaga C, Craig D, Amin N, Berr C, Lopez OL, De Jager PL, Deramecourt V, Johnston JA, Evans D, Lovestone S, Letenneur L, Moron FJ, Rubinsztein DC, Eiriksdottir G, Sleegers K, Goate AM, Fievet N, Huentelman MW, Gill M, Brown K, Kamboh MI, Keller L, Barberger-Gateau P, McGuinness B, Larson EB, Green R, Myers AJ, Dufouil C, Todd S, Wallon D, Love S, Rogaeva E, Gallacher J, St George-Hyslop P, Clarimon J, Lleo A, Bayer A, Tsuang DW, Yu L, Tsolaki M, Bossu P, Spalletta G, Proitsi P, Collinge J, Sorbi S, Sanchez-Garcia F, Fox NC, Hardy J, Deniz Naranjo MC, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Matthews F, Moebus S, Mecocci P, Del Zompo M, Maier W, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Nacmias B, Gilbert JR, Mayhaus M, Lannfelt L, Hakonarson H, Pichler S, Carrasquillo MM, Ingelsson M, Beekly D, Alvarez V, Zou F, Valladares O, Younkin SG, Coto E, Hamilton-Nelson KL, Gu W, Razquin C, Pastor P, Mateo I, Owen MJ, Faber KM, Jonsson PV, Combarros O, O'Donovan MC, Cantwell LB, Soininen H, Blacker D, Mead S, Mosley TH, Jr., Bennett DA, Harris TB, Fratiglioni L, Holmes C, de Bruijn RF, Passmore P, Montine TJ, Bettens K, Rotter JI, Brice A, Morgan K, Foroud TM, Kukull WA, Hannequin D, Powell JF, Nalls MA, Ritchie K, Lunetta KL, Kauwe JS, Boerwinkle E, Riemenschneider M,

- Boada M, Hiltunen M, Martin ER, Schmidt R, Rujescu D, Wang LS, Dartigues JF, Mayeux R, Tzourio C, Hofman A, Nothen MM, Graff C, Psaty BM, Jones L, Haines JL, Holmans PA, Lathrop M, Pericak-Vance MA, Launer LJ, Farrer LA, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Moskvina V, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD, Amouyel P. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*. 2013;45(12):1452-8.
- Lanoisélé H-M, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, Richard A-C, Pasquier F, Rollin-Sillaire A, Martinaud O, Quillard-Muraine M, de la Sayette V, Boutoleau-Bretonniere C, Etcharry-Bouyx F, Chauviré V, Sarazin M, le Ber I, Epelbaum S, Jonveaux T, Rouaud O, Ceccaldi M, Félician O, Godefroy O, Formaglio M, Croisile B, Auriacombe S, Chamard L, Vincent J-L, Sauvée M, Marelli-Tosi C, Gabelle A, Ozsancak C, Pariente J, Paquet C, Hannequin D, Campion D, collaborators of the CNRMAJp. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Medicine*. 2017;14(3):e1002270.
- Lasagna-Reeves CA, Glabe CG, Kaye R. Amyloid- $\beta$  Annular Protofibrils Evade Fibrillar Fate in Alzheimer Disease Brain. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(25):22122-30.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 2006;113(9):1217-24.
- Latta CH, Sudduth TL, Weekman EM, Brothers HM, Abner EL, Popa GJ, Mendenhall MD, Gonzalez-Oregon F, Braun K, Wilcock DM. Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid-beta using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12(1):243.
- Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *Journal of pharmacological methods*. 1986;16(4):355-7.
- Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Fassbender K. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: A similar pattern. *Neurobiology of aging*. 2009;30(5):759-68.
- Levin SG, Godukhin OV. Modulating Effect of Cytokines on Mechanisms of Synaptic Plasticity in the Brain. *Biochemistry Biokhimiia*. 2017;82(3):264-74.
- Levkovitz Y, Mendlovich S, Riwkes S, Braw Y, Levkovitch-Verbin H, Gal G, Fennig S, Treves I, Kron S. A double-blind, randomized study of

- minocycline for the treatment of negative and cognitive symptoms in early-phase schizophrenia. *The Journal of clinical psychiatry*. 2010;71(2):138-49.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, NY)*. 1995;269(5226):973-7.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5534):1487-91.
- Li J, Chen J, Mo H, Chen J, Qian C, Yan F, Gu C, Hu Q, Wang L, Chen G. Minocycline Protects Against NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation and P53-Associated Apoptosis in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Molecular neurobiology*. 2016;53(4):2668-78.
- Li J, Wen PY, Li WW, Zhou J. Upregulation effects of Tanshinone IIA on the expressions of NeuN, Nissl body, and I $\kappa$ B and downregulation effects on the expressions of GFAP and NF- $\kappa$ B in the brain tissues of rat models of Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2015;26(13):758-66.
- Lim YY, Villemagne VL, Pietrzak RH, Ames D, Ellis KA, Harrington K, Snyder PJ, Martins RN, Masters CL, Rowe CC, Maruff P. APOE epsilon4 moderates amyloid-related memory decline in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2015;36(3):1239-44.
- Lin L, Huang QX, Yang SS, Chu J, Wang JZ, Tian Q. Melatonin in Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*. 2013a;14(7):14575-93.
- Lin W, Ding M, Xue J, Leng W. The role of TLR2/JNK/NF- $\kappa$ B pathway in amyloid beta peptide-induced inflammatory response in mouse NG108-15 neural cells. *International immunopharmacology*. 2013b;17(3):880-4.
- Lin W, Ding M, Xue J, Leng W. The role of TLR2/JNK/NF- $\kappa$ B pathway in amyloid  $\beta$  peptide-induced inflammatory response in mouse NG108-15 neural cells. *International immunopharmacology*. 2013c;17(3):880-4.
- Liston A, Masters SL. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(3):208-14.
- Liu F, Guo X, Wu R, Ou J, Zheng Y, Zhang B, Xie L, Zhang L, Yang L, Yang S, Yang J, Ruan Y, Zeng Y, Xu X, Zhao J. Minocycline supplementation for treatment of negative symptoms in early-phase

schizophrenia: a double blind, randomized, controlled trial. *Schizophrenia research*. 2014;153(1-3):169-76.

Liu P, Reed MN, Kotilinek LA, Grant MK, Forster CL, Qiang W, Shapiro SL, Reichl JH, Chiang AC, Jankowsky JL, Wilmot CM, Cleary JP, Zahs KR, Ashe KH. Quaternary Structure Defines a Large Class of Amyloid-beta Oligomers Neutralized by Sequestration. *Cell reports*. 2015;11(11):1760-71.

Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B, Rube CE, Walter J, Heneka MT, Hartmann T, Menger MD, Fassbender K. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012a;188(3):1098-107.

Liu X, Wu Z, Hayashi Y, Nakanishi H. Age-dependent neuroinflammatory responses and deficits in long-term potentiation in the hippocampus during systemic inflammation. *Neuroscience*. 2012b;216:133-42.

Liu Y-H, Giunta B, Zhou H-D, Tan J, Wang Y-J. Immunotherapy for Alzheimer disease—the challenge of adverse effects. *Nature reviews Neurology*. 2012c;8(8):465-9.

Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *Journal of neuroinflammation*. 2016;13:297.

[http://www.kcl.ac.uk/ioppn/depts/oldage/research/Pharmacological-Studies/Clinical-Trials/minocycline-in-alzheimers-disease-\(MADE\).aspx](http://www.kcl.ac.uk/ioppn/depts/oldage/research/Pharmacological-Studies/Clinical-Trials/minocycline-in-alzheimers-disease-(MADE).aspx): 2014; 2015 [cited 2015].

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.

Lu Y, Xiao G, Luo W. Minocycline Suppresses NLRP3 Inflammasome Activation in Experimental Ischemic Stroke. *Neuroimmunomodulation*. 2016;23(4):230-8.

Maria Florencia I, Filippo C, Augusto Claudio C. A Link Between Nerve Growth Factor Metabolic Deregulation and Amyloid- $\beta$ -Driven Inflammation in Down Syndrome. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 2016;15(4):434-47.

Mathews BR. Memory dysfunction. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2015;21(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry):613-26.

McGuinness B, Craig D, Bullock R, Passmore P. Statins for the prevention of dementia. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016(1):Cd003160.

- Moller C, Vrenken H, Jiskoot L, Versteeg A, Barkhof F, Scheltens P, van der Flier WM. Different patterns of gray matter atrophy in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2013;34(8):2014-22.
- Mufson EJ, He B, Nadeem M, Perez SE, Counts SE, Leurgans S, Fritz J, Lah J, Ginsberg SD, Wu J, Scheff SW. Hippocampal ProNGF Signaling Pathways and  $\beta$ -Amyloid Levels in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2012;71(11):1018-29.
- Mukumoto N, Nakayama M, Akasaka H, Shimizu Y, Osuga S, Miyawaki D, Yoshida K, Ejima Y, Miura Y, Umetani K, Kondoh T, Sasaki R. Sparing of tissue by using micro-slit-beam radiation therapy reduces neurotoxicity compared with broad-beam radiation therapy. *Journal of Radiation Research*. 2017;58(1):17-23.
- Mun M-J, Kim J-H, Choi J-Y, Jang W-C. Genetic polymorphisms of interleukin genes and the risk of Alzheimer's disease: An update meta-analysis. *Meta Gene*. 2016;8:1-10.
- Murray CA, Lynch MA. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(8):2974-81.
- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*. 2014;511(7509):348-52.
- Nakagawa Y, Chiba K. Role of Microglial M1/M2 Polarization in Relapse and Remission of Psychiatric Disorders and Diseases. *Pharmaceuticals*. 2014;7(12):1028-48.
- Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia Development and function. *Annual review of immunology*. 2014;32:367-402.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2012;71(5):362-81.
- Nevado-Holgado AJ, Lovestone S. Determining the Molecular Pathways Underlying the Protective Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory

- Drugs for Alzheimer's Disease: A Bioinformatics Approach. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2017;15:1-7.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5726):1314-8.
- Noble W, Garwood C, Stephenson J, Kinsey AM, Hanger DP, Anderton BH. Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(3):739-50.
- Nolan Y, Maher FO, Martin DS, Clarke RM, Brady MT, Bolton AE, Mills KH, Lynch MA. Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(10):9354-62.
- Nunes MA, Schöwe NM, Monteiro-Silva KC, Baraldi-Tornisielo T, Souza SIG, Balthazar J, Albuquerque MS, Caetano AL, Viel TA, Buck HS. Chronic Microdose Lithium Treatment Prevented Memory Loss and Neurohistopathological Changes in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PloS one*. 2015;10(11):e0142267.
- O'Bryant SE, Hobson V, Hall JR, Waring SC, Chan W, Massman P, Lacritz L, Cullum CM, Diaz-Arrastia R. Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2009;17(2):337-41.
- O'Bryant SE, Hobson VL, Hall JR, Barber RC, Zhang S, Johnson L, Diaz-Arrastia R. Serum brain-derived neurotrophic factor levels are specifically associated with memory performance among Alzheimer's disease cases. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2011a;31(1):31-6.
- O'Bryant SE, Hobson VL, Hall JR, Barber RC, Zhang S, Johnson L, Diaz-Arrastia R, for the Texas Alzheimer's Research C. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Specifically Associated with Memory Performance among Alzheimer's Disease Cases. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2011b;31(1):31-6.
- O'Donnell E, Vereker E, Lynch MA. Age-related impairment in LTP is accompanied by enhanced activity of stress-activated protein kinases: analysis of underlying mechanisms. *The European journal of neuroscience*. 2000;12(1):345-52.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*. 2003;39(3):409-21.

- Panza F, Frisardi V, Imbimbo BP, Seripa D, Solfrizzi V, Pilotto A. Monoclonal antibodies against beta-amyloid (Abeta) for the treatment of Alzheimer's disease: the Abeta target at a crossroads. Expert opinion on biological therapy. 2011;11(6):679-86.
- Parachikova A, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM, Green KN. Reductions in amyloid-beta-derived neuroinflammation, with minocycline, restore cognition but do not significantly affect tau hyperphosphorylation. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2010;21(2):527-42.
- Parajuli B, Sonobe Y, Horiuchi H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Oligomeric amyloid beta induces IL-1beta processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. Cell death & disease. 2013;4:e975.
- Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. ed<sup>a</sup>, editor. San Diego: Academic Press; 2004.
- Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, Arevalo JC, Lee R, Hempstead B, Ferrer I, Iglesias M, Espinet C. Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. The American journal of pathology. 2005;166(2):533-43.
- Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. Journal of neuropathology and experimental neurology. 2004;63(6):641-9.
- Perlman RL. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. Evolution, Medicine, and Public Health. 2016;2016(1):170-6.
- Perneckzy R, Wagenpfeil S, Komossa K, Grimmer T, Diehl J, Kurz A. Mapping scores onto stages: mini-mental state examination and clinical dementia rating. The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry. 2006;14(2):139-44.
- Perry EK, Johnson M, Ekonomou A, Perry RH, Ballard C, Attems J. Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. Neurobiology of disease. 2012;47(2):155-62.
- Pierce AL, Bullain SS, Kawas CH. Late-Onset Alzheimer Disease. Neurologic clinics. 2017;35(2):283-93.
- Pietrzak RH, Lim YY, Neumeister A, Ames D, Ellis KA, Harrington K, Lautenschlager NT, Restrepo C, Martins RN, Masters CL, Villemagne VL, Rowe CC, Maruff P. Amyloid-beta, anxiety, and cognitive decline in

- preclinical Alzheimer disease: a multicenter, prospective cohort study. *JAMA psychiatry*. 2015;72(3):284-91.
- Piotrowska A, Popiolek-Barczyk K, Pavone F, Mika J. Comparison of the Expression Changes after Botulinum Toxin Type A and Minocycline Administration in Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Microglial and Astroglial Cultures. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7:141.
- Podlesniy P, Kichev A, Pedraza C, Saurat J, Encinas M, Perez B, Ferrer I, Espinet C. Pro-NGF from Alzheimer's Disease and Normal Human Brain Displays Distinctive Abilities to Induce Processing and Nuclear Translocation of Intracellular Domain of p75NTR and Apoptosis. *The American journal of pathology*. 2006;169(1):119-31.
- Poling A, Morgan-Paisley K, Panos JJ, Kim EM, O'Hare E, Cleary JP, Lesne S, Ashe KH, Porritt M, Baker LE. Oligomers of the amyloid-beta protein disrupt working memory: confirmation with two behavioral procedures. *Behavioural brain research*. 2008;193(2):230-4.
- Popova NK, Ilchibaeva TV, Naumenko VS. Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF) and the Serotonergic System of the Brain. *Biochemistry Biokhimiia*. 2017;82(3):308-17.
- Prade E, Bittner HJ, Sarkar R, Lopez del Amo JM, Althoff-Ospelt G, Multhaup G, Hildebrand PW, Reif B. Structural Mechanism of the Interaction of Alzheimer Disease A $\beta$  Fibrils with the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID) Sulindac Sulfide. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(48):28737-45.
- Prakash A, Medhi B, Chopra K. Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid-beta induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2013;110:46-57.
- Prati F, Cavalli A, Bolognesi ML. Navigating the Chemical Space of Multitarget-Directed Ligands: From Hybrids to Fragments in Alzheimer's Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2016;21(4):466.
- Prischmann J. Life and death in Alzheimer's disease. *Minnesota medicine*. 2016;99(1):20-1.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Abeta physiology. *Neuroscience*. 2015;307:26-36.
- Quintanilla RA, Orellana DI, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Experimental cell research*. 2004;295(1):245-57.

- Rabinovici GD, Stephens ML, Possin KL. Executive Dysfunction. *Continuum : Lifelong Learning in Neurology*. 2015;21(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry):646-59.
- Ramanan VK, Risacher SL, Nho K, Kim S, Shen L, McDonald BC, Yoder KK, Hutchins GD, West JD, Tallman EF, Gao S, Foroud TM, Farlow MR, De Jager PL, Bennett DA, Aisen PS, Petersen RC, Jack CR, Toga AW, Green RC, Jagust WJ, Weiner MW, Saykin AJ, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging I. GWAS of longitudinal amyloid accumulation on (18)F-florbetapir PET in Alzheimer's disease implicates microglial activation gene IL1RAP. *Brain : a journal of neurology*. 2015;138(10):3076-88.
- Ramirez-Bermudez J. Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. *Archives of medical research*. 2012;43(8):595-9.
- Ramos Bernardes da Silva Filho S, Oliveira Barbosa JH, Rondinoni C, Dos Santos AC, Garrido Salmon CE, da Costa Lima NK, Ferriolli E, Moriguti JC. Neuro-degeneration profile of Alzheimer's patients: A brain morphometry study. *NeuroImage Clinical*. 2017;15:15-24.
- Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature neuroscience*. 2016;19(8):987-91.
- Rapsinski GJ, Wynosky-Dolfi MA, Oppong GO, Tursi SA, Wilson RP, Brodsky IE, Tukul C. Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infection and immunity*. 2015;83(2):693-701.
- Resende R, Ferreira E, Pereira C, Resende de Oliveira C. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience*. 2008;155(3):725-37.
- Rezazadeh M, Khorrami A, Yeghaneh T, Talebi M, Kiani SJ, Heshmati Y, Gharepouran J. Genetic Factors Affecting Late-Onset Alzheimer's Disease Susceptibility. *Neuromolecular medicine*. 2016;18(1):37-49.
- Ridge PG, Hoyt KB, Boehme K, Mukherjee S, Crane PK, Haines JL, Mayeux R, Farrer LA, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Kauwe JS. Assessment of the genetic variance of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2016.
- Robinson JL, Geser F, Corrada MM, Berlau DJ, Arnold SE, Lee VM, Kawas CH, Trojanowski JQ. Neocortical and hippocampal amyloid-beta and tau measures associate with dementia in the oldest-old. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 12):3708-15.
- Robinson JL, Molina-Porcel L, Corrada MM, Raible K, Lee EB, Lee VMY, Kawas CH, Trojanowski JQ. Perforant path synaptic loss

correlates with cognitive impairment and Alzheimer's disease in the oldest-old. *Brain : a journal of neurology*. 2014;137(9):2578-87.

Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain research*. 2003;975(1-2):207-13.

Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:756357.

Ruiz-Muñoz AM, Nieto-Escamez FA, Aznar S, Colomina MT, Sanchez-Santed F. Cognitive and histological disturbances after chlorpyrifos exposure and chronic A $\beta$ (1-42) infusions in Wistar rats. *NeuroToxicology*. 2011;32(6):836-44.

Rygiel K. Novel strategies for Alzheimer's disease treatment: An overview of anti-amyloid beta monoclonal antibodies. *Indian journal of pharmacology*. 2016;48(6):629-36.

Sabbagh MN, Cooper K, DeLange J, Stoehr JD, Thind K, Lahti T, Reisberg B, Sue L, Vedders L, Fleming SR, Beach TG. Functional, Global and Cognitive Decline Correlates to Accumulation of Alzheimer's Pathology in MCI and AD(). *Current Alzheimer research*. 2010;7(4):280-6.

Sadowsky CH, Galvin JE. Guidelines for the management of cognitive and behavioral problems in dementia. *Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM*. 2012;25(3):350-66.

Salehi-Sadaghiani M, Javadi-Paydar M, Gharedaghi MH, Zandieh A, Heydarpour P, Yousefzadeh-Fard Y, Dehpour AR. NMDA receptor involvement in antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;223(3):345-55.

Sancho M, Herrera AE, Gortat A, Carbajo RJ, Pineda-Lucena A, Orzaez M, Perez-Paya E. Minocycline inhibits cell death and decreases mutant Huntingtin aggregation by targeting Apaf-1. *Human molecular genetics*. 2011;20(18):3545-53.

Savva GM, Wharton SB, Ince PG, Forster G, Matthews FE, Brayne C. Age, neuropathology, and dementia. *The New England journal of medicine*. 2009;360(22):2302-9.

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science (New York, NY)*. 1992;258(5082):668-71.

- Schipper HM. Apolipoprotein E: implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiology of aging*. 2011;32(5):778-90.
- Schmidt R, Hofer E, Bouwman FH, Buerger K, Cordonnier C, Fladby T, Galimberti D, Georges J, Heneka MT, Hort J, Laczó J, Molinuevo JL, O'Brien JT, Religa D, Scheltens P, Schott JM, Sorbi S. EFNS-ENS/EAN Guideline on concomitant use of cholinesterase inhibitors and memantine in moderate to severe Alzheimer's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2015;22(6):889-98.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*. 2004;164(4):1495-502.
- Schneider F, Baldauf K, Wetzel W, Reymann KG. Behavioral and EEG changes in male 5xFAD mice. *Physiol Behav*. 2014;135:25-33.
- Schulte-Herbruggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarcoo D, Renz H, Braun A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *Journal of neuroimmunology*. 2005;160(1-2):204-9.
- Seabrook TJ, Jiang L, Maier M, Lemere CA. Minocycline affects microglia activation, Abeta deposition, and behavior in APP-tg mice. *Glia*. 2006;53(7):776-82.
- Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural brain research*. 2008;192(1):106-13.
- Serrano-Pozo A, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT. Plaque-Associated Local Toxicity Increases over the Clinical Course of Alzheimer Disease. *The American journal of pathology*. 2016;186(2):375-84.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2011;1(1):a006189.
- Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT. Differential Relationships of Reactive Astrocytes and Microglia to Fibrillar Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2013;72(6):462-71.
- Sery O, Povova J, Misek I, Pesak L, Janout V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia*

- neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences. 2013;51(1):1-9.
- Shahzad K, Bock F, Al-Dabet MdM, Gadi I, Nazir S, Wang H, Kohli S, Ranjan S, Mertens PR, Nawroth PP, Isermann B. Stabilization of endogenous Nrf2 by minocycline protects against Nlrp3-inflammasome induced diabetic nephropathy. *Scientific reports*. 2016;6:34228.
- Shepherd A, Tyebji S, Hannan AJ, Burrows EL. Translational Assays for Assessment of Cognition in Rodent Models of Alzheimer's Disease and Dementia. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2016;60(3):371-82.
- Shirjang S, Mansoori B, Solali S, Hagh MF, Shamsasenjan K. Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: An up-to-date review. *Cellular Immunology*. 2017;315:1-10.
- Shrestha P, Klann E. Alzheimer's disease: Lost memories found. *Nature*. 2016;531(7595):450-1.
- Sohrabifar N, Gharesouran J, Talebi M, Ghojzadeh M, Mohaddes Ardebili SM. Association of CLU and TLR2 gene polymorphisms with late-onset Alzheimer disease in a northwestern Iranian population. *Turkish journal of medical sciences*. 2015;45(5):1082-6.
- Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Todarello O, Pellicani V, Capurso SA, Pietrarossa G, Santamato V, Capurso A, Panza F. Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006;364(1-2):91-112.
- Song L, Pei L, Yao S, Wu Y, Shang Y. NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2017;11:63.
- Sopova K, Gatsiou K, Stellos K, Laske C. Dysregulation of neurotrophic and haematopoietic growth factors in Alzheimer's disease: from pathophysiology to novel treatment strategies. *Current Alzheimer research*. 2014;11(1):27-39.
- Sousa C, Biber K, Michelucci A. Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:198.
- Sparacia G, Agnello F, La Tona G, Iaia A, Midiri F, Sparacia B. Assessment of cerebral microbleeds by susceptibility-weighted imaging in Alzheimer's disease patients: A neuroimaging biomarker of the disease. *The neuroradiology journal*. 2017:1971400916689483.
- Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molecular aspects of medicine*. 2012;33(1):83-97.

- Stover KR, Brown RE. Age-related changes in visual acuity, learning and memory in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*. 2012;231(1):75-85.
- Stuart KE, King AE, Fernandez-Martos CM, Dittmann J, Summers MJ, Vickers JC. Mid-life environmental enrichment increases synaptic density in CA1 in a mouse model of A $\beta$ -associated pathology and positively influences synaptic and cognitive health in healthy ageing. *The Journal of comparative neurology*. 2017;525(8):1797-810.
- Sudheimer KD, O'Hara R, Spiegel D, Powers B, Kraemer HC, Neri E, Weiner M, Hardan A, Hallmayer J, Dhabhar FS. Cortisol, cytokines, and hippocampal volume interactions in the elderly. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:153.
- Swardfager W, Lanctot K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*. 2010;68(10):930-41.
- Szekely CA, Zandi PP. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and Alzheimer's disease: the epidemiological evidence. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2010;9(2):132-9.
- Tan MS, Yu JT, Jiang T, Zhu XC, Tan L. The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*. 2013;48(3):875-82.
- Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology*. 2015.
- Tarr AJ, McLinden KA, Kranjac D, Kohman RA, Amaral W, Boehm GW. The effects of age on lipopolysaccharide-induced cognitive deficits and interleukin-1 $\beta$  expression. *Behavioural brain research*. 2011;217(2):481-5.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(8):2580-8.
- Tu S, Wong S, Hodges JR, Irish M, Piguet O, Hornberger M. Lost in spatial translation - A novel tool to objectively assess spatial disorientation in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Cortex*. 2015;67:83-94.
- Tukel C, Nishimori JH, Wilson RP, Winter MG, Keestra AM, van Putten JP, Baumler AJ. Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cellular microbiology*. 2010;12(10):1495-505.

- Tukel C, Wilson RP, Nishimori JH, Pezeshki M, Chromy BA, Baumler AJ. Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. *Cell host & microbe*. 2009;6(1):45-53.
- Tursi SA, Lee EY. Bacterial amyloid curli acts as a carrier for DNA to elicit an autoimmune response via TLR2 and TLR9. 2017;13(4):e1006315.
- Tuszynski MH, Yang JH, Barba D, U HS, Bakay R, Pay MM, Masliah E, Conner JM, Kobalka P, Roy S, Nagahara AH. Nerve Growth Factor Gene Therapy Activates Neuronal Responses in Alzheimer's Disease. *JAMA neurology*. 2015;72(10):1139-47.
- Udan ML, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR. Toll-like receptors 2 and 4 mediate A $\beta$ (1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *Journal of neurochemistry*. 2008;104(2):524-33.
- Ueda K, Fukui Y, Kageyama H. Amyloid  $\beta$  protein-induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid  $\beta$  protein. *Brain research*. 1994;639(2):240-4.
- Ul-Haq Z, Naz S, Mesaik MA. Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2016;32:3-15.
- Vickers JC, Mitew S, Woodhouse A, Fernandez-Martos CM, Kirkcaldie MT, Canty AJ, McCormack GH, King AE. Defining the earliest pathological changes of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*. 2016;13(3):281-7.
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park J-S, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The aging systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011;477(7362):90-4.
- von Bernhardi R, Eugenin-von Bernhardi J, Flores B, Eugenin Leon J. Glial Cells and Integrity of the Nervous System. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;949:1-24.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(13):3974-80.
- Walsh DM, Selkoe DJ. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein and peptide letters*. 2004;11(3):213-28.

- Wang D, Li S, Chen J, Liu L, Zhu X. The Effects of Astilbin on Cognitive Impairments in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cellular and molecular neurobiology*. 2017a;37(4):695-706.
- Wang D, Zhang J, Jiang W, Cao Z, Zhao F, Cai T, Aschner M, Luo W. The role of NLRP3-CASP1 in inflammasome-mediated neuroinflammation and autophagy dysfunction in manganese-induced, hippocampal-dependent impairment of learning and memory ability. *Autophagy*. 2017b:1-14.
- Wang G-L, He Z-M, Zhu H-Y, Gao Y-G, Zhao Y, Yang H, Zhang L. Involvement of serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems in the antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1, a major active ingredient of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Journal of ethnopharmacology*.
- Wang H-C, Yu Y-Z, Liu S, Zhao M, Xu Q. Peripherally administered sera antibodies recognizing amyloid- $\beta$  oligomers mitigate Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3 $\times$  Tg-AD mice. *Vaccine*. 2016a;34(15):1758-66.
- Wang J, Tan L, Wang HF, Tan CC, Meng XF, Wang C, Tang SW, Yu JT. Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2015a;44(2):385-96.
- Wang J, Wei Q, Wang CY, Hill WD, Hess DC, Dong Z. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(19):19948-54.
- Wang LZ, Tian Y, Yu JT, Chen W, Wu ZC, Zhang Q, Zhang W, Tan L. Association between late-onset Alzheimer's disease and microsatellite polymorphisms in intron II of the human toll-like receptor 2 gene. *Neurosci Lett*. 2011;489(3):164-7.
- Wang S, Yu L, Yang H, Li C, Hui Z, Xu Y, Zhu X. Oridonin Attenuates Synaptic Loss and Cognitive Deficits in an A $\beta$ (1-42)-Induced Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PloS one*. 2016b;11(3):e0151397.
- Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, Gifillian S, Krishnan GM, Sudhakar S, Zinselmeyer BH, Holtzman DM, Cirrito JR, Colonna M. TREM2 lipid sensing sustains microglia response in an Alzheimer's disease model. *Cell*. 2015b;160(6):1061-71.
- Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature*. 2001;414(6860):212-6.
- Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, Pietrzik CU, Ozols V, Fauq A, Golde TE, Koo EH. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs

decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(34):31831-7.

Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC, Harvey D, Jack CR, Jr., Jagust W, Morris JC, Petersen RC, Saykin AJ, Shaw LM, Toga AW, Trojanowski JQ. Recent publications from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Reviewing progress toward improved AD clinical trials. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2017.

Westin K, Buchhave P, Nielsen H, Minthon L, Janciauskiene S, Hansson O. CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease. *PloS one*. 2012;7(1):e30525.

Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(5):1763-71.

Wu Z, Zou X, Zhu W, Mao Y, Chen L, Zhao F. Minocycline is effective in intracerebral hemorrhage by inhibition of apoptosis and autophagy. *Journal of the neurological sciences*. 2016;371:88-95.

Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, Shi W, Li F, Xin T, Pang Q, Yi F. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014;34(4):660-7.

Yang T, Li S, Xu H. Large Soluble Oligomers of Amyloid beta-Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. 2017;37(1):152-63.

Yin S-b, Zhang X-g, Chen S, Yang W-t, Zheng X-w, Zheng G-q. Adenosine A(2A) Receptor Gene Knockout Prevents 1-3,4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Dyskinesia by Downregulation of Striatal GAD67 in 6-OHDA-Lesioned Parkinson's Mice. *Frontiers in Neurology*. 2017;8:88.

Zhang H, Petit GH, Gaughwin PM, Hansen C, Ranganathan S, Zuo X, Smith R, Roybon L, Brundin P, Mobley WC, Li JY. NGF rescues hippocampal cholinergic neuronal markers, restores neurogenesis, and improves the spatial working memory in a mouse model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington's disease*. 2013a;2(1):69-82.

Zhang R, Miller RG, Madison C, Jin X, Honrada R, Harris W, Katz J, Forsheo DA, McGrath MS. Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology*. 2013b;256(1-2):38-42.

- Zhao Y, Zhao J, Zhang M, Zhao Y, Li J, Ma X, Huang T, Pang H, Wang B, Song J. Involvement of Toll Like Receptor 2 Signaling in Secondary Injury during Experimental Diffuse Axonal Injury in Rats. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:1570917.
- Zhou K, Shi L, Wang Y, Chen S, Zhang J. Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:9238290.
- Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*. 2002;417(6884):74-8.
- Zolezzi JM, Inestrosa NC. Wnt/TLR Dialog in Neuroinflammation, Relevance in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:187.
- Zotova E, Bharambe V, Cheaveau M, Morgan W, Holmes C, Harris S, Neal JW, Love S, Nicoll JA, Boche D. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid-beta42 immunization. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 9):2677-96.

## ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense

Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito da minociclina associada com memantina na ativação da microglia e inflamação induzida pela administração do peptídeo  $\beta$ - amilóide (142), um modelo animal de doença de Alzheimer em camundongos.**", registrada com o protocolo nº **052/2016-2**, sob a responsabilidade de **Josiane Budni**, junto à equipe: Michelle Lima Garcez, Tatiani Bellettini dos Santos, Francielle Gonçalves Mina, Gustavo Skiavo, Aline Pereira da Luz, Franciellen Gonçalves Carneiro, Maylton Grégori Sheid, Matheus Andrighetti, Renan Bolfe - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **18/10/2016**, **substituindo o protocolo 080/20151, o qual foi cancelado (os 248 animais restantes – não utilizados, não devem ser utilizados em outras pesquisas sem a autorização da CEUA.**

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	20/10/2016 a 20/10/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Balb/C
Nº de animais	288
Idade/Peso	Adultos / 25-35 g

Sexo	Masculino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: **“Effect of minocycline associated to memantine on microglia activation and inflammation induced by amyloid- $\beta$  (1-42) peptide administration, an animal model of Alzheimer disease in mice.”**

Protocol number: **052/2016-2**

Principal Investigator: **Josiane Budni**

Researchers: **Michelle Lima Garcez, Tatiani Bellettini dos Santos, Francielle Gonçalves Mina, Gustavo Skiavo, Aline Pereira da Luz, Franciellen Gonçalves Carneiro, Maylton Grégori Sheid, Matheus Andrighetti, Renan Bolfe.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 18 de outubro de 2016.



Jairo José Zocche  
Coordenador da CEUA