DENISE KINOSHITA

# Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a Doença de Alzheimer

**São Paulo**
**2012**

DENISE KINOSHITA

# Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a Doença de Alzheimer

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

**Departamento:**
Patologia

**Área de Concentração:**
Patologia Experimental e Comparada
**Orientador:**
Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha
**Co-orientador:**
Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa-Pinto

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO**

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2550
FMVZ

Kinoshita, Denise

Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a Doença de Alzheimer / Denise Kinoshita. -- 2012.

133 p.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha.
Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa-Pinto.

1. Camundongo 3xTg-AD. 2. Citocinas. 3. Comportamento. 4. Doença de Alzheimer. 5. Neuroimunologia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a doença de Alzheimer", protocolado sob o nº 2067/2010, utilizando 140 (cento e quarenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 08/12/2010.

We certify that the Research "Temporal analysis of inflammatory mediators in neuronal tissue and in periphery of 3xTg-AD mice, an animal model of Alzheimer disease", protocol number 2067/2010, utilizing 140 (one hundred and forty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/08/2010.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

1934 | 2009 USP FMVZ 75

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

**FOLHA DE AVALIAÇÃO**

Nome: KINOSHITA, Denise

Título: Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a Doença de Alzheimer

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Data:__/__/__

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família:

Aos meus pais, **Paulo** e **Alice**, que compreenderam minhas escolhas, falhas e ausências. Vocês têm a medida perfeita entre oferecer apoio quando necessário, e confiar em um filho quando ele precisa de independência.

E aos meus irmãos, **Lú** e **Ricardo**, meu eterno porto seguro, que sempre cuidaram de mim.

# AGRADECIMENTO ESPECIAL

**Lú,**

é difícil acreditar que "acabou". Talvez porque, como você mesmo diz, nunca acaba. Já perdi a conta dos anos que se passaram desde que entrei na sua sala pela primeira vez, das vezes que vi sua porta aberta e estiquei o pescoço só pra dizer um alô, das vezes que você me perguntou "Está tudo bem?" e, depois da resposta afirmativa, uma nova pergunta "E os experimentos (a tese, o artigo), tudo bem?". O aluno, o orientado, o amigo... Eles eram sua maior preocupação. E continuará sendo. Porque nunca acaba. Os experimentos, as dúvidas, a vontade de fazer e discutir ciência, sua maneira sempre humana de se relacionar com seus orientados e amigos, e a profunda admiração que tenho por você. Nada disso acabará... Cientista brilhante, professor por vocação, inovador como poucos. Muitíssimo obrigada por tudo, Lú!

# AGRADECIMENTOS

**Natô**, companheiro de experimentos, de discussões científicas, filosóficas, ou triviais. Nunca me recusou um café! Quanta coisa você me ensinou, hein? Sobre ciência, política, religião, arte... Sobre mim mesma. Apesar de toda essa sabedoria (ou será por conta dela?), é um dos melhores ouvintes que já conheci. E se tornou um dos melhores amigos também! Obrigada por todo apoio! Os dias difíceis se tornaram mais fáceis depois de um cafezinho.

Agradeço aos demais amigos que participaram diretamente deste trabalho:
**Lydia**, obrigada por todos os ensinamentos, pela generosa receptividade, e pela empolgação à cada p significativo!
**Alison**, Alisão! Obrigada por toda ajuda, pela paciência com os milhares de eppendorfs, pelas dicas científicas, profissionais e pessoais. Tenho uma grande admiração por você, acredite! Estou segura que terá um futuro repleto de realizações!
**Milena**... Quantas risadas eu te devo? Divertida quando convinha, séria quando necessário. Você sempre soube equilibrar tudo muito bem. Obrigada por tudo Mi!
**Thiago**, cara trabalhador! Quase passamos o Natal trabalhando, hein? Sua ajuda foi fundamental, obrigada!
**Fred**, apesar de todos os compromissos, voltou pra bancada quando precisei. Agradeço a paciência, os ensinamentos e conselhos. Você faz muita falta!

Agradeço a imprescindível ajuda do professor **Jarbas Bauer**, que pacientemente me ensinou a dissecar o hipocampo de camundongos.

Agradeço ao professor **Luiz Roberto Britto** e ao excelente técnico **Adilson** por me receberem em seu laboratório e oferecerem valiosa ajuda na imunohistoquímica e na interpretação das lâminas, e ao professor **José Luiz Catão Dias**, que se dispôs gentilmente a observar os cortes de imunohistoquímica, oferecendo preciosas sugestões.

Aos amigos do Instituto de Neurociências, em Barcelona, pela agradável convivência: **Virgínia**, **Lidia Manzo**, **Paula**, **Raquel**, **Ismael**, **Silvia**.

Aos técnicos do laboratório **Herculano** e **Vagner**; e aos funcionários do biotério **Idalina**, **Rosires**, **Luciana**, **Mauro** e **Nelsinho**, pela agradável companhia e por nunca negarem ajuda.

Ao professor **João Palermo Neto** que com sua sábia liderança consegue manter este grupo unido há anos. Sinto muito orgulho de participar de um grupo multidisciplinar por natureza, e mesmo assim, tão coeso! Aos amigos do grupo de Neuroimunomodulação: **Adriano, André**, **Atílio, Bel, Bruno Honda, Camila, Carol**, **prof.Cris Massoco, Daniel, Dudu**, **Eduardo (Márcio)**, **Emily**, **Glaucie, Ilana**, **João Gimenes, Lilian, Lu Vismari, prof. Luciano, prof. Martha, Mônica**, **Poliana**, **Renato**, **Rodrigo**, **Tiemi**, **Thalita, Thiago Kirsten**, **Thiago Marinho, Vinícius**, **Viviane**, **Wanderley**. Terei ótimas lembranças de todos vocês!

À **FAPESP** pelo projeto temático (09/51886-3), e ao **CNPq** pela bolsa de doutorado. Ao **Banco Santander**, pela Bolsa de Mobilidade Internacional para o estágio sanduíche no Instituto de Neurociências da Universidade Autônoma de Barcelona.

## RESUMO

KINOSHITA, D. **Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a Doença de Alzheimer**. [Temporal analysis of inflammatory mediators in neuronal tissue and periphery in 3xTg-AD mice, an animal model for Alzheimer's Disease]. 2012. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A Doença de Alzheimer é a causa mais freqüente de demência senil e os gastos com pacientes com demência já supera os de pacientes com câncer ou com doenças cardiovasculares. As lesões características dessa doença são as placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares. A neuroinflamação também está presente na maioria dos pacientes com Alzheimer, e parece contribuir para o dano no tecido neuronal. Adicionalmente, estudos vêm demonstrando que pacientes com Alzheimer também apresentam alterações sistêmicas, e, dessas, a mais relatada é o estado pró-inflamatório em tecidos periféricos, permitindo que a Doença de Alzheimer seja estudada em um contexto neuroimunológico. Utilizando um modelo murino para a Doença de Alzheimer, o camundongo 3xTg-AD (que desenvolve ambas as patologias β-amilóide e tau), investigamos se aumento de mediadores inflamatórios também pode ser detectado nesse modelo, tanto no hipocampo (estrutura relevante para os sintomas da doença) como no sangue. Alterações cognitivas e comportamentais e a presença do precursor da proteína amilóide (APP) e/ ou peptídeo β-amilóide em estruturas cerebrais relevantes para a doença (córtex, hipocampo, subículo e amígdala) permitiram validar o camundongo 3xTg-AD como um modelo murino da Doença de Alzheimer. Análises da expressão de mediadores inflamatórios no hipocampo demonstraram que a presença de APP e/ ou peptídeo β-amilóide no cérebro não induz um estado pró-inflamatório no hipocampo ou no sangue, até os 12 meses de idade. Porém, a expressão de APP e/ ou peptídeo β-amilóide no cérebro parece induzir distúrbios sistêmicos, já que algumas alterações periféricas foram encontradas. Como a resposta ao LPS envolve tanto tecidos periféricos, como o Sistema Nervoso Central, avaliou-se os efeitos da administração periférica de LPS nesse camundongo, aos 12 meses de idade. A resposta inflamatória ao LPS diferiu entre camundongos Wild Type (grupo controle) e 3xTg-

AD. No sangue, menor aumento de IL-6 e MCP-1 e maior aumento de IFN-γ foram encontrados nos camundongos 3xTg-AD. As conseqüências deste perfil de citocinas séricas no Sistema Nervoso Central foram distintas, dependendo da resposta avaliada: enquanto que a ativação do eixo HPA foi semelhante, a produção de citocinas inflamatórias no hipocampo foi atenuada. Portanto, no camundongo 3xTg-AD, a diferente resposta inflamatória ao LPS no sangue promoveu menor produção de mediadores inflamatórios no hipocampo.

Palavras-chave: Camundongo 3xTg-AD. Citocinas. Comportamento. Doença de Alzheimer. Neuroimunologia. Peptídeo β-amilóide.

## ABSTRACT

KINOSHITA, D. **Temporal analysis of inflammatory mediators in neuronal tissue and periphery in 3xTg-AD mice, an animal model for Alzheimer's Disease**. [Análise temporal de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e na periferia em camundongos 3xTg-AD, um modelo animal para a Doença de Alzheimer]. 2012. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Alzheimer's Disease is the most frequent cause of senil dementia and the costs with demented patients already exceeds that of patients with cancer or cardiovascular diseases. The characteristic lesions of this disease are amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Neuroinflammation is also present in most of Alzheimer's patients, and seems to contribute to neuronal tissue damage. In addition, studies have demonstrated that patients with Alzheimer also display systemic alterations, and of those, the most reported is the pro-inflammatory state in peripheral tissues, allowing Alzheimer's Disease to be studied in a neuroimmunology context. Using a murine model of Alzheimer's Disease, the 3xTg-AD mice (which develops both amyloid-βand tau pathologies), we investigated whether enhancement of inflammatory mediators can also be detected in this model, in both hippocampus (a relevant structure for the symptoms of the disease) and in blood. Cognitive and behavioral alterations and the presence of amyloid precursor protein (APP) and/ or amyloid-β peptide in relevant brain structures for the disease (cortex, hippocampus, subiculum and amigdala) allowed the validation of 3xTg-AD mice as a murine model of Alzheimer's Disease. Analysis of inflammatory mediators expression in hippocampus demonstrated that the presence of APP and/ or amyloid-β peptide in the brain does not induce a pro-inflammatory state in hippocampus or in the blood, until 12 months of age. Nevertheless, APP and/or amyloid-β peptide expression in the brain seems to induce systemic disturbances, once peripheral alterations were detected. As LPS response includes both peripheral tissues and the Central Nervous System, we evaluated peripheral administration effects of LPS in these mice, at 12 months of age. The inflammatory response to LPS differed between Wild Type (control group) and 3xTg-AD. In the blood, smaller enhancement of IL-6 and MCP-1 and higher enhancement of IFN-γ were found in 3xTg-AD mice. The consequences of this serum cytokine profile on the Central Nervous System were distinct,

depending on the response evaluated: while HPA axis activation was similar, production of inflammatory cytokines in hippocampus was attenuated. Therefore, in the 3xTg-AD mice, a different inflammatory response to LPS in blood promoted lesser inflammatory mediators production in hippocampus.

Key-words: 3xTg-AD mice. Cytokines. Behavior. Alzheimer's Disease. Neuroimmunology. Amyloid-β peptide.

## LISTA DE FIGURAS


Figura 1 – Cérebro de um paciente com Alzheimer..... 27

Figura 2 – Processamento de peptídeo β-amilóide e proteína tau.....29

Figura 3 – Exemplo de microdissecção de hipocampo.....48

Figura 4 – Dot plot de beads das citocinas avaliadas por citometria de fluxo.....50

Figura 5 – Representação esquemática das regiões utilizadas para análise da presença de petídeo β-amilóide.....53

Figura 6 – Labirinto de Barnes, com furo alvo e representação de um furo não alvo.....56

Figura 7 – Labirinto de Barnes: Erros primários e latência primária durante testes de treinamento.....63

Figura 8 – Labirinto de Barnes: Distância percorrida e velocidade para encontrar o furo alvo durante os testes de treinamento e comportamento de *freezing* no D1.....64

Figura 9 – Labirinto de Barnes: Exploração e locomoção após encontrar o furo alvo durante os testes de treinamento.....67

Figura 10 – Labirinto de Barnes: Teste Prova.....69

Figura 11 – Labirinto de Barnes: Número de visitas para cada furo durante o teste prova.....71

Figura 12 – Caixa Claro Escuro: Tempo gasto no compartimento claro.....72

Figura 13 – Caixa Claro-Escuro.....73

Figura 14 – Caixa Claro-Escuro: número de acesso de risco, realizado do compartimento claro, para o escuro.....74

Figura 15 – Campo aberto: Habituação durante 4 dias.....75

Figura 16– Fotomicrografia do hipocampo.....77

Figura 17 – Fotomicrografia do subículo.....78

Figura 18 – Fotomicrografia do córtex.....79

Figura 19 – Fotomicrografia da amígdala.....80

Figura 20 – Fotomicrografia de depósito extra-celular.....81

Figura 21 – Níveis basais de corticosterona sérica (ng/mL) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades.....84

Figura 22 – Peso corpóreo (gramas) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades.....85

Figura 23 – Peso relativo do timo (% de peso corpóreo) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades.....86

Figura 24 – Peso relativo das adrenais (% de peso corpóreo) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades.....87

Figura 25 – Peso relativo do baço (% de peso corpóreo) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades.....88

Figura 26 – Peso relativo do fígado (% de peso corpóreo) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades.....89

Figura 27 – Níveis séricos (pg/mL) de IL-12p70 [A] e TNF-α [B] em camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de 12 meses de idade, após administração de salina ou LPS.....91

Figura 28 – Níveis séricos (pg/mL) de IL-10 em camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de 12 meses de idade, após administração de salina ou LPS.....91

Figura 29 – Níveis séricos (pg/mL) de IL-6 [A] e MCP-1 [B] em camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de 12 meses de idade, após administração de salina ou LPS.....92

Figura 30 – Níveis séricos (pg/mL) de INF-γ em camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de 12 meses de idade, após administração de salina ou LPS.....93

Figura 31 – Níveis de corticosterona após administração de salina ou LPS nos camundongos Wild Type e 3xTg-AD de 12 meses de idade.....94

Figura 32 – Expressão de IL-1β [A] e IL-6 [B] após administração de salina ou LPS nos camundongos Wild Type e 3xTg-AD de 12 meses de idade.....95

Figura 33 – Representação dos efeitos da administração i.p. de LPS na produção de citocinas periféricas e no SNC, em camundongos 3xTg-AD de 12 meses de idade.....119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis de citocinas séricas (pg/mL) dos animais Wild Type nas diferentes idades..... 82

Tabela 2 – Níveis de citocinas séricas (pg/mL) dos animais 3xTg-AD nas diferentes idades..... 82

Tabela 3 – Níveis de citocinas séricas (pg/mL) dos animais Wild-Type nas diferentes idades..... 83

Tabela 4 – Níveis de citocinas séricas (pg/mL) dos animais 3xTg-AD nas diferentes idades..... 83

Tabela 5 – Expressão de RNAm relativa de IL-1β no hipocampo de camundongos Wild Type e 3xTg-AD nas diferentes idades..... 89

Tabela 6 – Expressão de RNAm relativa de IL-6 no hipocampo de camundongos Wild Type e 3xTg-AD nas diferentes idades..... 90

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| 3×Tg-AD | Camundongo triplo transgênico – modelo para Doença de Alzheimer |
| APP | *Amyloid Precursor Protein* |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| BLA | Amígdala basolateral |
| CA | Campo Aberto |
| CCE | Caixa Claro Escuro |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| IFN-γ | Interferon- γ |
| IL-1β | Interleucina - 1β |
| IL-6 | Interleucina -6 |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| IL-12p70 | Interleucina-12p70 |
| LB | Labirinto de Barnes |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MCP-1 | *Monocyte chemotactic protein* TNF-α |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TNF-α | Tumor necrosis factor-α |
| TP | Teste Prova |
| WT | Wild Type |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO..... 21**

**2 REVISÃO DE LITERATURA..... 22**

**2.1 Aspectos gerais da Doença de Alzheimer..... 22**

2.1.1 Incidência, prevalência e perspectiva histórica..... 22

2.1.2 Aspectos moleculares: placas amilóides, placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares..... 26

2.1.3 Diagnóstico, tratamentos e influência de fatores ambientais..... 30

**2.2 Modelos animais para o estudo da Doença de Alzheimer..... 32**

**2.3 3×Tg-AD – modelo animal triplo transgênico..... 33**

**2.4 Outros aspectos da Doença de Alzheimer – neuroimunologia..... 35**

2.4.1 Doenças neurodegenerativas e sistema imune..... 36

2.4.2 Inflamação na Doença de Alzheimer – Sistema Nervoso Central e Periferia..... 39

**3 OBJETIVOS..... 45**

**3.1 Objetivos específicos..... 45**

**4 MATERIAL E MÉTODOS..... 46**

**4.1 Animais..... 46**

**4.2 Soluções e Reagentes..... 46**

**4.3 Procedimentos..... 47**

4.3.1 Coleta de tecidos e tratamentos..... 47

4.3.2. Avaliação de citocinas periféricas – Citometria de Fluxo (Cytometric Bead Array)..... 49

4.3.3 Avaliação de citocinas centrais - RT-PCR..... 50

4.3.4 Análise dos níveis de peptídeo β- amilóide no cérebro – Imunohistoquímica..... 51

4.3.5 Avaliação dos níveis séricos de corticosterona – Ensaio imuno-enzimático..... 53

4.3.6 Aparatos comportamentais e procedimentos..... 54

*4.3.6.1 Avaliação da memória espacial no Labirinto de Barnes (LB)*..... 54

*4.3.6.2 Avaliação de comportamento semelhante à ansiedade na Caixa Claro Escuro (CCE)*..... 56

*4.3.6.3 Avaliação da locomoção e habituação em Campo Aberto (CA)*..... 57

**4.4 Delineamento experimental..... 58**

4.4.1 Experimento 1: Avaliação do fenótipo comportamental..... 58

4.4.2 Experimento 2: Avaliação temporal, descritiva, de peptídeo β-amilóide no SNC..... 58

4.4.3 Experimento 3: Avaliação temporal de IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α e IL-10 no sangue..... 58

4.4.4 Experimento 4: Avaliação temporal e de IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α e IL-10 e de corticosterona no sangue e expressão de IL-1β e IL-6 no SNC, e de outros parâmetros periféricos..... 58

4.4.5 Experimento 5: Efeitos da administração de LPS em camundongos 3xTg-AD de 12 meses de idade..... 59

**4.5 Análise Estatística.....** 60

**5 RESULTADOS.....** 62

**5.1 Experimento 1: Avaliação da memória espacial no Labirinto de Barnes e de comportamento semelhante à ansiedade na caixa claro-escuro.....** 62

*5.1.1 Labirinto de Barnes*..... 62

*5.1.2 Caixa Claro Escuro*..... 72

*5.1.3 Campo Aberto*..... 74

**5.2 Experimento 2: Avaliação temporal, descritiva, de peptídeo β-amilóide no SNC.....** 76

**5.3 Experimento 3: Avaliação temporal de citocinas no sangue.....** 82

**5.4 Experimento 4: Avaliação temporal e pareada de citocinas e de corticosterona no sangue e expressão de IL-1β e IL-6 no SNC, e de outros parâmetros periféricos.....** 83

**5.5 Experimento 5: Efeitos da administração de LPS na produção de citocinas periféricas e no SNC e nos níveis de corticosterona.....** 90

**6 DISCUSSÃO.....** 96

**6.1 Teste do labirinto de Barnes evidenciou que camundongos 3xTg-AD exibem distúrbios cognitivos e comportamentais em estágios iniciais da doença.....** 97

**6.2 Camundongos 3xTg-AD apresentam acúmulo de peptídeo β-amilóide e/ ou APP de forma dependente da idade e da região cerebral.....** 102

**6.3 Alterações na expressão de APP e/ ou peptídeo β-amilóide não são acompanhadas por aumento de citocinas no hipocampo ou no sangue. Apesar disso, algumas alterações periféricas foram observadas no camundongo 3xTg-AD.....** 107

**6.4 Alterações periféricas na resposta ao LPS parecem interferir na expressão de mediadores inflamatórios no SNC, mas não na ativação do eixo HPA.....** 112

**7 CONCLUSÕES.....** 120

**REFERÊNCIAS……..…** 121

# 1 INTRODUÇÃO

A incidência da Doença de Alzheimer aumentou significativamente nas últimas décadas, provavelmente devido ao aumento da expectativa de vida. Trata-se de uma enfermidade neuro-degenerativa cuja progressão pode se estender por anos, aumentando significativamente os custos de hospitalização e cuidados com o paciente. Apesar de sua alta incidência, existe grande escassez de conhecimento sobre sua etiopatogenia.

Aumento de mediadores inflamatórios no Sistema Nervoso Central em pacientes com Alzheimer vem sendo muito relatado. Muitos trabalhos também demonstraram alterações dos níveis desses mediadores na periferia. Especula-se se um fenômeno poderia desencadear o outro, ou se são eventos independentes.

O presente trabalho pretendeu investigar, de forma temporal, alterações de mediadores inflamatórios no tecido neuronal e no tecido sanguíneo, e possíveis conseqüências dessas alterações. Este estudo foi realizado em um modelo animal para a Doença de Alzheimer, o camundongo 3×Tg-AD, que tem se demonstrado uma ótima alternativa para o estudo desta enfermidade.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

Será realizada revisão de dados e resultados da literatura pertinentes a este trabalho.

## 2.1 Aspectos gerais da Doença de Alzheimer

Serão abordados aspectos gerais da Doença de Alzheimer.

### 2.1.1 Incidência, prevalência e perspectiva histórica

A Doença de Alzheimer foi primeiramente descrita por Alois Alzheimer, em 1906. Na época, foi considerada uma doença rara, que causava demência. Os sintomas que a paciente de Alzheimer apresentava (e que são comuns a muitos pacientes dessa doença) eram: falha progressiva na memória, desordem da função cognitiva, alteração do comportamento (como paranóia, ilusões e comportamentos socialmente inapropriados) e declínio progressivo na linguagem. Somente após cerca de 60 anos da descrição da paciente de Alois Alzheimer, essa doença começou a ser considerada a causa mais freqüente de demência senil (SELKOE, 2001a), sendo caracterizada como uma doença neurodegenerativa progressiva.

Nos Estados Unidos, cerca de 5,4 milhões de pessoas sofrem de Doença de Alzheimer (REIMAN et al., 2011). No Brasil, um estudo realizado em Catanduva (interior de São Paulo), demonstrou que as taxas de prevalência da doença neste município eram semelhantes às mundiais (HERRERA JR. et al., 2002).

A incidência da Doença de Alzheimer aumentou significativamente devido ao aumento da expectativa de vida (que nos Estados Unidos, aumentou de 49 para 76 anos, durante o século XX) (SELKOE, 2001a), já que mais pessoas atingem idades em que a doença é mais prevalente. Atualmente, sua prevalência após os 65 anos é de 5%; e aos 85 anos, ela sobe para 30% (GALIMBERTI; SCARPINI, 2011). Ou

seja, espera-se que 30% dos indivíduos com 85 anos ou mais apresentem a doença. Sua relação com a idade avançada e seu desenvolvimento lento e progressivo (pacientes podem sobreviver por anos após o diagnóstico) fazem com que sua prevalência aumente drasticamente com o avançar da idade.

Existem duas formas da doença. Uma familiar, denominada de FAD (do inglês *Familial Alzheimer's Disease*), hereditária que atinge cerca de 5 a 15% dos pacientes e tem um estabelecimento precoce, ao redor dos 40 a 50 anos; e outra idiopática, cujo início ocorre mais tardiamente do que a FAD, ao redor dos 60 a 70 anos de idade, sendo responsável pela maioria dos casos da doença (CREWS; MASLIAH, 2010). A forma idiopática também pode ser denominada de esporádica ou LOAD (do inglês, *Late Onset Alzheimer's Disease*).

Durante décadas desde a descrição dos sintomas da paciente de Alois Alzheimer, pouco progresso foi realizado sobre a patogênese dessa doença. Somente com o advento da microscopia eletrônica, na década de 1960, Michael Kidd e Robert Terry foram capazes de descrever as lesões neurais ultra-estruturais que caracterizam da doença: placas neuríticas e emaranhados neuro-fibrilares (SELKOE, 2001a). Essas lesões serão descritas adiante.

Na década de 1970, estabeleceu-se a ligação entre os sintomas clínicos e as alterações neuroquímicas dos pacientes com Alzheimer. A demência provavelmente ocorria como resultado da degeneração de neurônios sintetizadores e liberadores de acetilcolina no cérebro. No final da década de 1970 e início dos anos 80, observou-se que outras classes de neurotransmissores apresentavam-se esgotados, o que permitiu a compreensão da ineficácia de tratamentos com drogas colinérgicas em muitos pacientes (SELKOE, 2001a).

Muitos estudos foram realizados na tentativa de identificar os materiais contidos nas placas neuríticas e nos emaranhados neuro-fibrilares. Em 1984, uma importante descoberta foi realizada por Glenner e Wong (1984a). Esses pesquisadores isolaram um material protéico dos vasos da meninge de um paciente com Alzheimer, ao qual nomearam β-amilóide (GLENNER; WONG, 1984a). No mesmo ano, os mesmos pesquisadores observaram que o peptídeo β-amilóide também estava presente em lesões do cérebro de um paciente com Síndrome de Down, doença caracterizada por trissomia do cromossomo 21 (GLENNER; WONG, 1984b). Isso levou à ligação entre essas duas doenças e a suposição de que o

produto de algum gene do cromossomo 21 participaria da patogenia dessas doenças (GLENNER; WONG, 1984b).

No final da década de 1980, realizou-se a clonagem do gene do peptídeo β-amilóide. Como especulado por Glenner e Wong (1984a), esse gene se localizava no cromossomo 21. Além disso, descobriu-se que esse peptídeo derivava de um precursor protéico maior: o precursor da proteína amilóide (APP, do inglês *Amyloid Precursor Protein*) (ROBAKIS et al., 1987).

No início da década de 1990, avanços na genética molecular permitiram outro salto na compreensão da patogenia dessa doença. Em 1990, foram identificadas mutações no gene da APP que levavam à deposição de peptídeo amilóide em alguns casos de FAD (LEVY et al., 1990; ST GEORGE-HYSLOP et al., 1990). Isso permitiu uma aproximação maior entre o gene da APP e seu produto (peptídeo β-amilóide) na patogênese da Doença de Alzheimer.

A descoberta das mutações do gene da APP levou a algumas suposições: outras mutações do gene da APP poderiam ser identificadas em pacientes com Alzheimer (o que de fato ocorreu); o peptídeo β-amilóide seria um produto normal do metabolismo da APP, e que mutações no gene dessa proteína influenciariam o aumento de produção do β-amilóide (LEVY et al., 1990); mutações em outros genes também influenciariam a produção do β-amilóide (como será abordado em seguida) (VAN BROECKHOVEN, et al., 1990), e que a deposição de β-amilóide seria fundamental na patogênese da Doença de Alzheimer.

Também em 1990, Van Broeckhoven et al. identificaram uma mutação de um gene em outro cromossomo. Esses pesquisadores observaram uma mutação no gene codificador da presenilina (localizado no cromossomo 14) em um caso familiar da doença de Alzheimer (VAN BROECKHOVEN, et al., 1990). Mais tarde, como será abordado posteriormente, verificou-se que a presenilina é uma enzima que faz parte do processamento da APP e da geração do peptídeo β-amilóide. Até o presente momento, foram identificadas 32 mutações no gene da APP, 182 no gene da presenilina 1 (PSEN1) e 13 no gene da presenilina 2 (PSEN2) (GALIMBERTI; SCARPINI, 2011).

Três anos mais tarde, Corder et al. (1993) verificaram uma relação entre polimorfismos do gene da apolipoproteína E e o desenvolvimento de LOAD. Esses pesquisadores observaram que a presença de um alelo deste gene, o alelo $\epsilon 4$ (APO$\epsilon 4$) aumenta o risco e diminui a idade de desenvolvimento da Doença de

Alzheimer (CORDER et al., 1993). Atualmente, a presença deste alelo no genoma de um indivíduo representa um fator de risco para a doença.

No ano seguinte, em 1994, o mesmo grupo de pesquisa verificou que o alelo ϵ2 promovia proteção contra à doença (CORDER et al., 1994). Mais tarde, verificou-se que as diferentes isoformas da apolipoproteína E afetam o clearance do peptídeo β-amilóide de forma diferente, sendo que a expressão do alelo ϵ4 induz ao acúmulo de β-amilóide com a idade, e a do alelo ϵ2 facilita a retirada do peptídeo (CASTELLANO et al., 2011).

A descoberta do peptídeo β-amilóide nas lesões dos cérebros de pacientes com FAD ou LOAD, a identificação de mutações em genes da APP e da presenilina em indivíduos com FAD e a associação do alelo ϵ4 como um fator de risco para o desenvolvimento de LOAD possuem o denominador comum: o peptídeo β-amilóide. Todas essas descobertas levaram à proposição da hipótese da cascata amilóide, que tenta estabelecer causas para a neurodegeneração e para os sintomas dos pacientes com Alzheimer.

A hipótese da cascata amilóide foi proposta por Hardy e Higgins em 1992, e reformulada em 2002 após novas descobertas (HARDY; HIGGINS, 1992; HARDY; SELKOE, 2002). Essa hipótese tenta estabelecer uma seqüência de eventos que culminariam com a neurodegeneração e demência dos pacientes.

Primeiramente, ocorreria quebra da proteína APP e aumento na produção de peptídeo β-amilóide. A não ser nos casos de FAD (em que há mutações no gene da APP ou da presenilina) ou na presença do alelo ϵ4, não se sabe por que ocorre o acúmulo do peptídeo. Especula-se que falha em mecanismos de *clearance* estejam envolvidos (CREWS; MASLIAH, 2010; SELKOE, 2002). Em seguida, haveria o acúmulo e deposição do peptídeo em forma de placas, que promoveria injúria neuronal e nas sinapses. Os danos neuronal e sináptico provocariam alteração na homeostase iônica dos neurônios, ativando quinases e fosfatases intracelulares, causando hiperfosforilação da proteína tau e formação dos emaranhados neurofibrilares (uma descrição mais detalhada das placas amilóides e dos emaranhados neurofibrilares será realizada adiante). Todas essas alterações resultariam em déficits sinápticos, perda neuronal e alterações neuroquímicas, com déficits de várias classes de neurotransmissores. A conseqüência clínica seria a demência (HARDY; HIGGINS, 1992; HARDY; SELKOE, 2002).

A hipótese reformulada trouxe causas adicionais de neurodegeneração: a ativação de células da glia em resposta ao peptídeo β-amilóide, com produção de citocinas e outros mediadores da inflamação. Esses últimos contribuiriam para o dano neuronal e demência apresentada pelos pacientes (HARDY; SELKOE, 2002). A participação das células da glia na patogênese da Doença de Alzheimer será abordada adiante.

Apesar de não contemplar todos os aspectos da Doença de Alzheimer (como a falta de correlação clara entre quantidade de placas amilóides e sintomas cognitivos), a hipótese da cascata amilóide é a mais aceita para explicar a neurodegeneração nesses pacientes.

### 2.1.2 Aspectos moleculares: placas amilóides, placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares

Como abordado anteriormente, as características patológicas que caracterizam a Doença de Alzheimer são as placas amilóides (DICKSON, 1997; SELKOE, 1998) e os emaranhados neurofibrilares (BUEE et al., 2000).

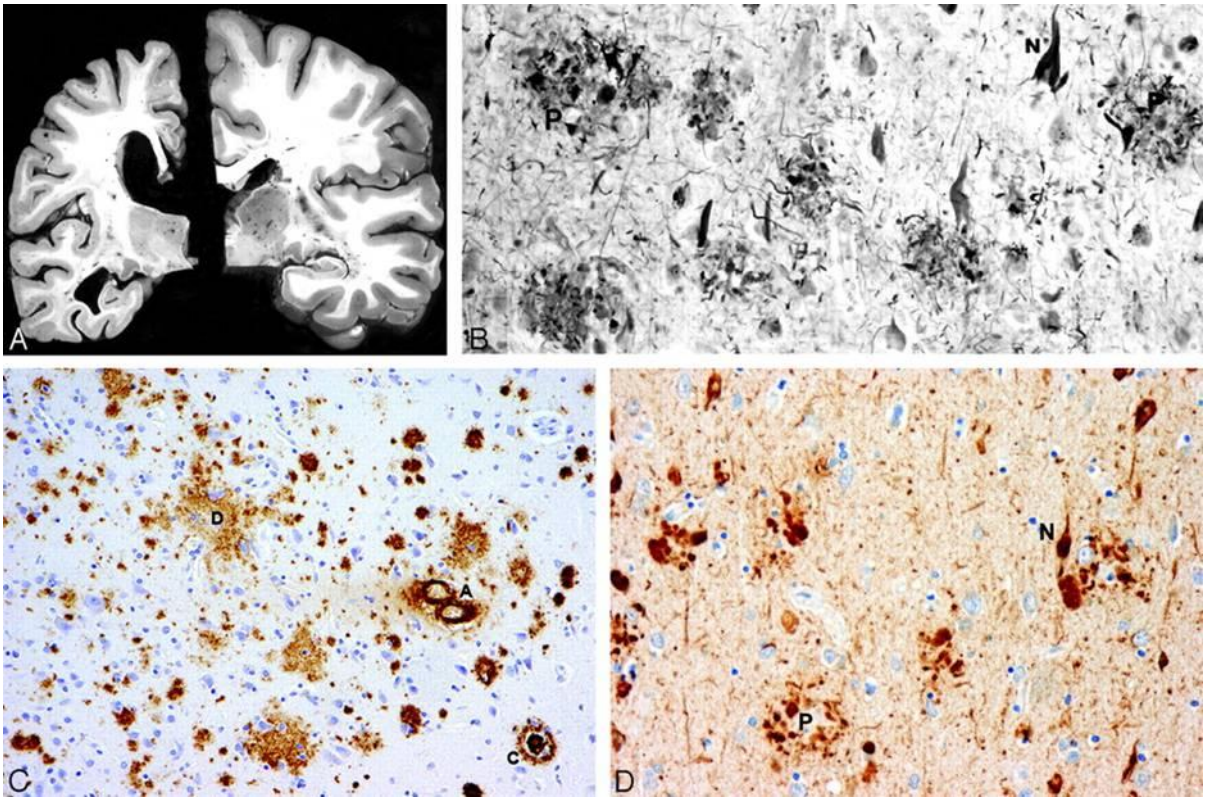
As placas amilóides (também denominadas de placas senis) são depósitos extracelulares de peptídeo β-amilóide, que podem se apresentar de duas formas. Quando associadas aos neuritos distróficos são denominadas de placas neuríticas (DICKSON, 1997) (Figura – 1). Os neuritos distróficos são neurônios (pertencentes à diversas classes de neurotransmissores) dilatados e tortuosos, com aberrações ultra-estruturais que incluem lisossomos aumentados, maior número de mitocôndrias e filamentos em dupla hélice. As placas neuríticas são encontradas em maior quantidade no córtex associativo e límbico, e também podem estar associadas à microglia ativada (DICKSON, 1997). Nessas placas, o peptídeo β-amilóide encontra-se em forma filamentosa, formando fibrilas, e é constituído em grande parte por $A\beta_{42}$ (peptídeos compostos por 42 aminoácidos), mas também por $A\beta_{40}$.

As placas amilóides também podem se apresentar em uma forma mais amorfa, menos fibrilar, com um padrão mais granular. Nesse caso, são denominadas de placas difusas, ou pré-amilóides. Em geral, as placas difusas não estão associadas a neuritos distróficos nem à microglia ativada, e são compostas apenas

por $A\beta_{42}$ (IWATSUBO et al., 1994). Atualmente, considera-se que as placas difusas sejam lesões precursoras das placas neuríticas (SELKOE, 2001a).

Os emaranhados neurofibrilares, também conhecidos como inclusões, são aberrações neuronais intracelulares caracterizadas por alterações na proteína tau (proteína estrutural de microtúbulos) cuja fosforilação encontra-se aumentada. Alterações estruturais dessa proteína levam à sua dissociação dos microtúbulos e agregação em regiões citoplasmáticas próximas ao núcleo em forma de fibras. Como os emaranhados neurofibrilares estão presentes em outras doenças neurodegenerativas, acredita-se que sejam conseqüência de injúria celular. No caso da Doença de Alzheimer, seria conseqüência da resposta celular ao acúmulo progressivo da proteína β-amilóide (SELKOE, 2001a).

Figura 1 – Cérebro de um paciente com Alzheimer. A figura mostra intensa atrofia cerebral e dilatação dos ventrículos laterais [A]. [B, C, D] Presença de placas neuríticas (P) e emaranhados neurofibrilares (N).




Fonte: (WIPPOLD 2ND et al., 2008).

A proteína β-amilóide constitui uma família de peptídeos, cujos tamanhos variam de 39 a 43 aminoácidos, que se originam da quebra de uma proteína transmembrânica estrutural, a proteína precursora de amilóide (APP, do inglês *amyloid precursor protein*), cuja função não é muito bem conhecida.

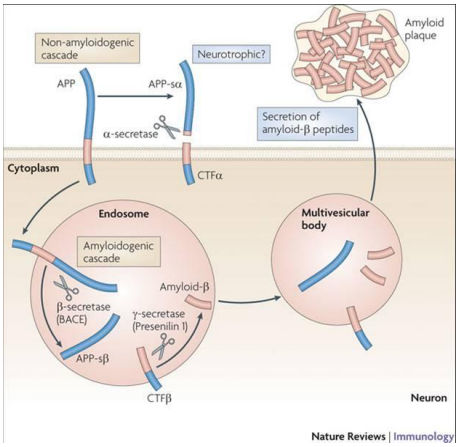
A APP pode sofrer dois tipos de processamentos proteolíticos: uma via não amiloidogênica e outra amiloidogênica (Figura – 2) (RIVEST, 2009). Na cascata não amiloidogênica, ocorre a clivagem da APP na membrana celular. Através da ação de α-secretase ocorre a produção de dois fragmentos que não se agregam: um fragmento com terminal α-carboxila (CTF-α, do inglês *C-terminal* fragment), que permanece na membrana e pode sofrer processamentos posteriores; e um fragmento solúvel com α-amino terminal (APP-sα, do inglês *soluble N-terminal fragment*), que é liberado para o meio extracelular, onde parece ter propriedades neuroprotetoras. Na via amiloidogênica, a APP é internalizada dentro de endossomos onde sofre clivagens seqüenciais. A ação de β-secretase (por exemplo, a BACE, do inglês *β-site APP- cleaving enzime*, enzima clivadora de APP na região β) resulta na formação de dois fragmentos: um fragmento solúvel com β-amino terminal (APP-sβ) e um fragmento com terminal β-carboxila (CTF-β), que permanece na membrana do endossomo. O CTF-β sofre uma clivagem posterior por γ-secretase (um complexo proteolítico que contém presenilina 1, entre outras enzimas), liberando o peptídeo β-amilóide. Este pode permanecer dentro da célula, ou ser secretado para o meio extracelular, onde se agrega, formando depósitos (RIVEST, 2009).

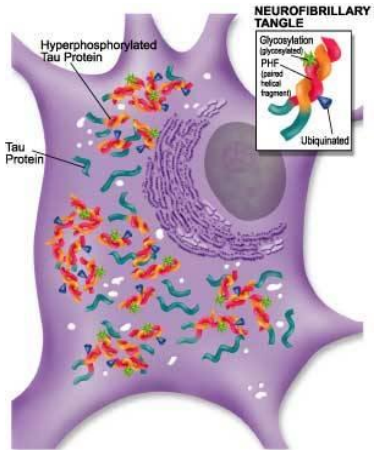
Vale lembrar que secretase é um termo genérico que se refere a um grupo de proteases que quebram inúmeras proteínas de membrana (VINGTDEUX; MARAMBAUD, 2012). Portanto, α-secretase, β-secretase e γ-secretase não são enzimas específicas, e referem-se a um grupo ou complexo de enzimas responsáveis pela quebra da APP. Eles foram assim denominados, devido ao desconhecimento de todos os seus constituintes.

A proteína tau também é uma proteína estrutural, porém de microtúbulos, que auxilia a manutenção do citoesqueleto das células neuronais (Figura – 2). A fosforilação e posterior agregação desta proteína provocam desestabilização dos microtúbulos, o que parece estar associado a um declínio funcional dos neurônios (LAU et al., 2008), devido à falha no transporte axonal (pela perda da estrutura do

citoesqueleto) e conseqüente disfunção sináptica e neurodegeneração (ROY et al., 2005).

Figura 2 – Processamento de peptídeo β-amilóide e proteína tau. Representação da proteína APP e seu processamento, gerando peptídeos β-amilóide que se depositam no meio extracelular (à esquerda). Representação da proteína tau e sua hiperfosforilação, gerando emaranhados neurofibrilares (à direita)




Rivest, 2009 R&D Systems®

A perda neuronal dos pacientes está relacionada com a quantidade de emaranhados neurofibrilares (GOMEZ-ISLA et al., 1997); e a atrofia cerebral (decorrente da perda neuronal) parece ser responsável pelos sintomas clínicos da doença (déficits cognitvos e desordens comportamentais) (SAVVA et al., 2009). O peptídeo β-amilóide também pode contribuir para a injúria sináptica e dendrítica e, portanto, para a disfunção neuronal (WALSH et al., 2002). Além do dano neuronal causado pela presença do peptídeo β-amilóide, o mesmo também pode induzir injúrias indiretas, através da ativação da microglia resultando em produção de mediadores inflamatórios (como será descrito adiante).

Apesar de depósitos de peptídeo β-amilóide em muitos indivíduos induzir a patologia tau, não se encontrou nenhuma relação entre a quantidade de placas e a de emaranhados neurofibrilares (PRICE et al., 2009). Estresse oxidativo e inflamação também foram atribuídos à hiperfosforilação da proteína tau (MCNAULL et al., 2010).

### 2.1.3 Diagnóstico, tratamentos e influência de fatores ambientais

O diagnóstico clínico da Doença de Alzheimer nem sempre é simples, e em geral é realizado somente quando a demência está estabelecida. Em geral, cerca de 8 anos antes do diagnóstico clínico o paciente apresenta um declínio cognitivo leve (MCI, do inglês *mild cognitive impairment*), que pode ser confundido com conseqüências do envelhecimento ou estresse (FODERO-TAVOLETTI et al., 2011). Ainda, cerca de 40 a 60% dessas pessoas desenvolvem Doença de Alzheimer de fato (FODERO-TAVOLETTI et al., 2011), o que dificulta ainda mais o diagnóstico.

O diagnóstico definitivo de Alzheimer pode ser realizado somente através de avaliações histopatológicas do tecido cerebral, *post-mortem* (KARRAN; MERCKEN; STROOPER et al., 2011). Até a confirmação *post-mortem*, o diagnóstico da doença é tido como *provável*.

A primeira tentativa de estabelecer critérios para o diagnóstico clínico da Doença de Alzheimer foi publicada em 1984 (MCKHANN et al., 1984), e denominada de critério NINCDS-ADRDA (do inglês *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer´s Disease and Related Disorders Association*). As diretrizes incluíam histórico médico, exames clínicos, testes neuropsicológicos e testes laboratoriais. Apesar de serem eficazes e confiáveis (apresentando cerca de 80% de sensibilidade de diagnóstico), esses critérios foram revistos e reformulados em 2011 pelas instituições *National Institue of Aging* e *Alzheimer´s Association*. Nessas novas diretrizes foram introduzidos critérios para diagnóstico diferencial com outras doenças ou estados causadores de demência, critérios para busca de biomarcadores (utilizados em testes clínicos, com finalidades para pesquisa), e outros sintomas e sinais apresentados pelos pacientes, entre outros (MCKHANN et al., 2011).

Quanto ao tratamento, apenas aqueles que amenizam os sintomas (tratamentos sintomáticos) estão disponíveis (KARRAN; MERCKEN; STROOPER, 2011). Estes incluem inibidores de acetilcolinesterase como donezepil (Aricept®, Eisai/Pfizer), galantamina (Razadyne®, Johnson & Johnson) e rivastigmina (Exelon®, Novartis); e antagonistas de receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) como a memantina (Ebix$^{TM}$, Merz Pharma GmbH & Co.KGaA). Os tratamentos com anti-colinesterásicos tentam reverter os déficits colinérgicos decorrentes da degeneração

neuronal. Não se sabe como a memantina melhora os sintomas dos pacientes (KARRAN; MERCKEN; STROOPER, 2011).

As novas terapias em desenvolvimento (ainda sob investigação) objetivam inibir a produção, aumentar o clearance, ou inibir a agregação do peptídeo β-amilóide (BLENNOW, 2010). Por este motivo são classificados como drogas modificadoras da doença (do inglês *disease-modifying drugs)* (GALIMBERTI; SCARPINI, 2011). Inibidores de γ-secretase e potenciadores da α-secretase tentam reduzir a via amiloidogênica e aumentar a não-amiloidogênica, respectivamente, uma vez que essas vias competem entre si (FISHER, 2012). Estratégias para o aumento do *clearance* incluem a imunização ativa (com o peptídeo em si) e a imunização passiva (com anticorpos contra o peptídeo). O tramiprosato, a colostrinina e o scyllo-inositol são compostos que parecem inibir a agregação do peptídeo amilóide. Esses tratamentos encontram-se nas fases I ou II de testes clínicos (GALIMBERTI; SCARPINI, 2011).

A eficácia desses testes ainda não foi comprovada. A imunização de pacientes com peptídeo β-amilóide, por exemplo, resultou em redução da carga do peptídeo no cérebro, que, entretanto, não foi acompanhada de melhoras cognitivas (HOLMES et al., 2008).

Atualmente, há um grande esforço em se identificar biomarcadores que permitam estabelecer um diagnóstico precoce, prever o curso da doença e avaliar a eficácia de novos tratamentos (REIMAN et al., 2011). Acredita-se que os novos tratamentos em desenvolvimento sejam mais eficazes se iniciados em fases precoces da doença (em que o dano neuronal ainda não é tão evidente), quando o paciente apresenta apenas déficits cognitivos leves (REIMAN et al., 2011). Ou deveriam ser realizados naqueles casos familiares da doença em que uma mutação genética é detectada, antes do aparecimento dos sintomas (HAASS, 2010).

Por fim, parece haver associações entre fatores ambientais e a Doença de Alzheimer. Entretanto, essas associações não são claras. Fatores protetores seriam: alto nível educacional, uso de estrógenos, consumo moderado de vinho e atividade física regular. Fatores que aumentariam a probabilidade de um indivíduo desenvolver Alzheimer seriam: depressão, fumo, traumatismo craniano, desordens cardiovasculares (hipertensão, hipercolesterolemia, infarto do miocárdio) e baixo nível educacional (MAYEUX, 2006).

## 2.2 Modelos animais para o estudo da Doença de Alzheimer

Uma importante dificuldade nos estudos com pacientes com Alzheimer é estabelecer o grupo controle: jovens sadios apresentam o obstáculo da diferença de idade; idosos sadios e sem alterações cognitivas podem apresentar placas senis na ausência de sintomas. Isso acarreta em uma carência de diagnósticos precisos e escassez de conhecimentos sobre sua etiologia, e, conseqüentemente, de tratamentos eficazes. Outro complicador em estudos com testes clínicos é a dificuldade em detectar a doença em fases iniciais, quando os pacientes apresentam apenas déficits cognitivos sutis. Como abordado anteriormente, os novos tratamentos em desenvolvimento seriam mais eficazes se realizados precocemente. Dessa forma, modelos animais (particularmente camundongos) vêm sendo amplamente utilizados.

Modelos animais da Doença de Alzheimer (assim como outras doenças neurodegenerativas) tentam replicar um (ou mais) dos três aspectos da doença: seus sintomas, as lesões, ou suas causas (DUYCKAERTS; POTIER; DELATOUR, 2008). Modelos que replicam os sintomas de uma doença geralmente se relacionam com a topografia da lesão, mas não necessariamente mimetizam os mecanismos patogênicos. Um exemplo são estudos nos quais se realiza a depleção colinérgica em áreas cerebrais de camundongos (como já dito, alteração presente em pacientes com Alzheimer e que leva ao desenvolvimento dos sintomas da doença). Um exemplo de modelo que mimetiza as lesões da doença é a administração de peptídeo β-amilóide no hipocampo de camundongos. Já, modelos que reproduzem as causas da doença são aqueles que se utilizam da inserção de genes mutantes no genoma de um camundongo. No caso da Doença de Alzheimer, são os modelos que mimetizam as causas das formas familiares, mas não a forma esporádica, da Doença (DUYCKAERTS; POTIER; DELATOUR, 2008). Os modelos são limitados, porém úteis, ao intuito da pesquisa em questão.

Muitos modelos da Doença de Alzheimer foram desenvolvidos como fruto do estudo das formas familiares da doença. Apesar de essas formas apresentarem baixa prevalência entre pacientes com Alzheimer (5%) (GALIMBERTI; SCARPINI,

2011), as lesões histopatológicas e os sintomas clínicos são muito parecidos, e algumas vezes idênticos aos da forma esporádica (SELKOE, 2001a).

Como abordado anteriormente, as mutações mais prevalentes são mutações do gene da APP e genes codificadores de preselinina. Dessa forma, a maioria dos camundongos transgênicos que servem de modelo para a Doença de Alzheimer super expressa os genes humanos da APP e/ou da preselinina. Esses modelos apresentam β-amiloidose cerebral de uma forma muito semelhante aos humanos: placas β-amilóides (associadas a neuritos distróficos, perda de espinhos dendríticos, degeneração sináptica e neuro inflamação) e/ou angiopatia β-amilóide (associada à perda de células musculares lisas de vasos, que pode induzir ruptura dos mesmo) (JUCKER, 2010).

Estudos em camundongos transgênicos puderam prever de forma eficiente testes em humanos. Um exemplo foi o estudo da imunização ativa contra o peptídeo β-amilóide. Em camundongos e humanos, a imunização foi capaz de reduzir a carga do peptídeo no interstício, o que, porém, aumentou a quantidade do peptídeo nos vasos, induzindo micro sangramentos. Ainda, muitos estudos que verificaram ineficácia de tratamentos em camundongos, também encontraram resultados equivalentes em humanos (JUCKER, 2010). Talvez a conclusão mais robusta dos estudos com camundongos transgênicos seja a de que tratamentos que foquem em estágios iniciais sejam a melhor estratégia para conter a doença.

Jucker (2010) sugeriu cautela na terminologia “modelos animais para doenças neurodegenerativas”. Por exemplo, a nomenclatura correta para camundongos transgênicos para o gene da APP seria ‘modelo de β-amiloidose cerebral’ e não ‘modelo animal de Doença de Alzheimer’. Para facilitar a leitura, o termo modelo animal será utilizado como equivalente para modelo da patogenia em questão (β-amiloidose ou patogenia tau).

### 2.3 3×Tg-AD – modelo animal triplo transgênico

Oddo et al. (2003) desenvolveram um camundongo triplo transgênico (3×Tg-AD), cujo genoma integra genes humanos mutados codificadores de preselinina ($PS1_{M146V}$), proteína tau ($tau_{P301L}$) e proteína APP (APPswe – um gene mutante

primeiramente descrito na Suécia). Nesse modelo, uma célula embrionária de camundongo (knockin) homozigoto para o gene mutado da preselinina foi micro injetada com os genes mutados das proteínas tau e APP, ambos sob comando do promotor Thy1.2 (promotor que induz a expressão predominantemente no sistema nervoso central). Ambos os genes co-integraram na mesma região cromossômica (ODDO et al., 2003). Esse modelo surgiu pela observação de que camundongos (duplamente) transgênicos para os genes das proteínas APP e preselinina não desenvolviam emaranhados neurofibrilares (DUYCKAERTS; POTIER; DELATOUR, 2008), como era esperado considerando-se a hipótese da cascata amilóide. Dessa forma, um modelo animal que apresentasse as alterações patológicas características da Doença de Alzheimer (depósitos de proteína β-amilóide e emaranhados neurofibrilares) se fez de grande importância.

O camundongo 3×Tg-AD, desenvolvido por Oddo et al. (2003), apresenta tanto depósito de proteína β-amilóide, como emaranhados neurofibrilares de forma progressiva. Primeiramente, ocorreu o aparecimento de imunorreatividade intraneuronal para o peptídeo β-amilóide no neocórtex (3 a 4 meses de idade) e posteriormente no hipocampo (6 meses). A presença de peptídeo β-amilóide intracelular no hipocampo estava temporalmente relacionada com desenvolvimento de déficits de LTP (do inglês *Long Term Potentiation*), uma forma de plasticidade neuronal que participa dos processos de aprendizado e memória. Posteriormente, houve deposição de proteína β-amilóide extracelular no neocórtex (aos 6 meses de idade) e no hipocampo (12 meses) e então o aparecimento de emaranhados neurofibrilares, à partir de 12 meses de idade. Essa distribuição temporal parece corroborar com a hipótese da cascata amilóide. Tecidos periféricos não apresentaram expressão de peptídeos β-amilóide, que só foi encontrada em tecido neuronal (ODDO et al., 2003).

As vantagens práticas deste modelo animal são que, como os transgenes da APP e da proteína tau co-integraram na mesma região do cromossomo e o gene da preselinina foi inserido no lócus endógeno de PS1, a reprodução desses animais originará ninhadas igualmente triplo transgênicas e o *background* genético será sempre o mesmo (129/C57BL6).

Após o desenvolvimento deste modelo animal, estudos comportamentais foram realizados para verificar se as alterações neuro-patológicas estavam relacionadas com alterações cognitivas e comportamentais. Billings et al. (2005)

demonstraram que déficits na retenção de memória a longo prazo ocorriam concomitantemente ao acúmulo de peptídeo β-amilóide intraneuronal (4 meses de idade). Alterações comportamentais também foram detectadas: aos 10 meses de idade, esses camundongos apresentaram redução na atividade exploratória (HALAGAPPA et al., 2007).

Em um estudo dedicado à caracterização comportamental desse modelo animal, Pietropaolo, Feldon e Yee (2008) demonstraram que esses animais apresentam maior reatividade a estímulos aversivos, mais evidente aos 12 meses de idade. Também nessa idade, demonstraram hiperatividade e redução de habituação locomotora em aparatos experimentais. Tais alterações não cognitivas parecem assemelhar-se àquelas de maior irritabilidade e maior reatividade a estímulos nocivos apresentados por pacientes humanos com Alzheimer (PIETROPAOLO; FELDON; YEE, 2008)

Estes estudos levam a crer que o camundongo triplo transgênico desenvolvido por Oddo et al (2003) representa um modelo animal útil e eficaz para o estudo da Doença de Alzheimer, já que mimetiza tanto as alterações neuro-patológicas (anatômica e temporalmente), quanto os déficits cognitivos, e talvez comportamentais, presentes nos humanos portadores desta doença.

Jucker (2010) sustenta a seguinte opinião sobre estudos com modelos animais para doenças neurodegenerativas: "*A falha na transposição*" (de dados de animais para seres humanos) "*é menos decorrente da natureza incompleta dos modelos do que a interpretação equivocada desses modelos e de estudos pré-clínicos inadequados*."

## 2.4 Outros aspectos da Doença de Alzheimer – neuroimunologia

Além das placas de peptídeo β-amilóide e dos emaranhados neurofibrilares (que determinam o diagnóstico *pós-mortem* da Doença de Alzheimer), existem inúmeros relatos da presença de inflamação no cérebro de pacientes com Alzheimer. Dessa forma, muitos pesquisadores acreditam que a neuroinflamação tenha participação na patogênese desta enfermidade. Neste trabalho, a terminologia neuroinflamação caracterizará a presença de microglia ativada e/ou de proteínas

inflamatórias (como proteínas de fase aguda e citocinas) nas proximidades de placas β-amilóides do tecido cerebral, apesar da ausência de outros eventos que caracterizem inflamação (sinais clínicos e infiltrado polimorfonuclear) e do desconhecimento do papel exato de proteínas inflamatórias na Doença de Alzheimer (EIKELENBOOM et al., 2002).

O estudo da neuroinflamação na Doença de Alzheimer e em outras doenças neurodegenerativas abriu caminho a uma linha de pesquisa relativamente recente. Dessa forma, a neuroimunologia (o estudo entre as interações bidirecionais entre sistema nervoso e sistema imune) vem sendo inserida também no estudo de doenças neurodegenerativas. Devido à crescente atenção prestada a aspectos neuroimunológicos em doenças neurodegenerativas, será realizada uma breve revisão sobre esses estudos, a seguir.

### 2.4.1 Doenças neurodegenerativas e sistema imune

A suspeita de que o sistema imune poderia atuar sobre células neuronais originou-se da observação de que alterações imunológicas eram capazes de modular o comportamento, a temperatura corpórea e atividades neuroendócrinas de indivíduos. Às alterações comportamentais apresentadas por animais frente às infecções denominou-se comportamento associado à doença, e simplificado como comportamento doentio (HART, 1988).

O comportamento doentio representa uma resposta adaptativa bem organizada, que tem a função de aumentar a resistência de um animal frente a infecções e facilitar sua recuperação (JOHNSON, 2002). Um conjunto de alterações comportamentais são instaladas (redução da locomoção, da ingestão de alimentos, das interações sociais) para facilitar o desenvolvimento da febre e a adaptação da resposta imune à infecção (HART, 1988). Essa mudança comportamental é possível devido à comunicação existente entre o sistema imune periférico e o sistema nervoso central: mediadores inflamatórios liberados na periferia induzem a síntese e liberação de citocinas no cérebro (DANTZER, 2001; JOHNSON, 2002). O aumento de citocinas no cérebro parece modular esses comportamentos associados à

infecção (CRESTANI; SEGUY; DANTZER, 1991; DANTZER, 2001; MCCARTHY; KLUGER; VANDER, 1986)

Além do comportamento, citocinas também são capazes de produzir febre e modular a atividade do eixo HPA (hipófise-pituitária-adrenal) (BESEDOVSKY; REY, DEL, 1987). As alterações comportamentais, o desenvolvimento da febre e a ativação do eixo HPA com conseqüente liberação de glicocorticóides pelas adrenais permitem a conservação de energia, o aumento da imunidade e a prevenção de uma resposta inflamatória exacerbada (QUAN; HERKENHAM, 2002). Sob esse aspecto, as interações neuroimunológicas são adaptativas e aumentam a resistência durante infecções periféricas.

O envelhecimento pode alterar a resposta comportamental frente à inflamação periférica: camundongos idosos apresentaram comportamento doentio exacerbado (GODBOUT et al., 2005; KINOSHITA et al., 2009) e maior neuroinflamação após ativação do sistema imunológico periférico (GODBOUT et al., 2005). Acredita-se que isso seja decorrente da maior expressão basal de marcadores inflamatórios presente no cérebro dos idosos: em idosos, a ativação basal da microglia parece ser responsável pela maior neuroinflamação e expressão do comportamento doentio, em resposta a estímulos inflamatórios periféricos (GODBOUT et al., 2005). Dessa forma, o microambiente no SNC pode influenciar a resposta à ativação imune periférica.

O sistema imune no SNC difere substancialmente do sistema imune periférico devido aos seguintes aspectos: presença de barreira hemato-encefálica, reduzido número de células T e de células que expressam MHC (complexo de histo-compatibilidade) de classe I e II, e ausência de sistema linfático. Parece existir um baixo nível de atividade inflamatória (realizada pela microglia, astrócitos, macrófagos perivasculares e células T) que controla a homeostase do tecido (LYNCH; MILLS, 2012).

Como abordado, durante infecções periféricas, há uma comunicação entre o sistema imune periférico e o SNC. A conseqüente ativação do sistema imune no cérebro, nesse caso, permite a recuperação à doença (QUAN; HERKENHAM, 2002). Já, na neurodegeneração (e em menor grau, no envelhecimento), ocorre a perda de mecanismos que controlam a homeostase do tecido neuronal, resultando em inflamação patológica (LYNCH; MILLS, 2012).

Dessa forma, em doenças neurodegenerativas, células do sistema imunológico (e seus mediadores inflamatórios) podem ser prejudiciais ao tecido neuronal, participando da patogênese dessas doenças. Mediadores inflamatórios no tecido neuronal (principalmente citocinas) foram descritos como agravadores de doenças como Parkinson, Esclerose Múltipla e Doença de Alzheimer (QUAN; HERKENHAM, 2002). Lynch e Mills (2012) sugeriram que a neuroinflamação seja uma característica comum de muitas, e talvez de todas, as doenças neurodegenerativas. A neurodegeneração leva à morte neuronal e liberação de padrões moleculares associados a perigo (do inglês, *danger-associated molecular patterns*, DAMPs), que interagem com receptores de células da glia, disparando uma resposta inflamatória (LYNCH; MILLS, 2012).

A neuroinflamação em pacientes com Parkinson, assim como em outras doenças neurodegenerativas incluindo Alzheimer, parece ter um papel na perda neuronal. No Parkinson, neurônios dopaminérgicos parecem ser especialmente sensíveis a mediadores inflamatórios liberados pela microglia (como espécies reativas de oxigênio e TNF-α) (RINGHEIM; CONANT, 2004). Na Esclerose Múltipla, IL-1 e TNF-α participam da patogênese da doença, causando dano neuronal adicional (QUAN; HERKENHAM, 2002). Desta maneira, a neurodegeneração (e morte neuronal) induz ativação de células da glia, que respondem com produção de mediadores inflamatórios, que por sua vez ampliam o dano neuronal, gerando um ciclo destrutivo. A neuroinflamação na Doença de Alzheimer será abordada no tópico seguinte, mas, ao menos em relação ao ciclo da neurodegeneração induzindo neuroinflamação (e vice-versa) é semelhante ao Parkinson e à Esclerose Múltipla.

Apesar do reconhecimento de que a neuroinflamação muito provavelmente contribua para o dano neuronal e para a patogênese dessas doenças, em algumas circunstâncias a ativação de células imunes no tecido neuronal pode ser benéfica. Exemplos são os tratamentos que tentam induzir resposta da microglia ao peptídeo β-amilóide, como abordado anteriormente.

Complicadores do estudo neuroinflamação x doenças neurodegenerativas são: 1) a interação dinâmica entre as diversas citocinas, e entre citocinas e microglia (QUAN; HERKENHAM, 2002) e 2) as diferenças genéticas individuais com relação à ativação imune (PIEHL; OLSSON, 2009). Variabilidades individuais (e entre linhagens de camundongos) na resposta imune parecem influenciar a progressão de doenças neurodegenerativas ou de danos neuronais (PIEHL; OLSSON, 2009).

Embora o papel do sistema imune em doenças neurodegenerativas seja pouco compreendido, e abranja dúvidas tão cruciais como sua natureza benéfica ou prejudicial, há uma crescente tentativa de alguns pesquisadores em inseri-lo no estudo dessas doenças. Exemplos disso são grupos que estudaram: 1) biomarcadores imunológicos, numa tentativa de facilitar o diagnóstico de doenças neurodegenerativas (GOMEZ RAVETTI; MOSCATO, 2008; RAY et al., 2007), 2) diferenças na capacidade fagocítica ao peptídeo β-amilóide de monócitos circulantes, em pacientes com Alzheimer (AVAGYAN et al., 2009), e 3) a imunoterapia com anticorpos contra o peptídeo β-amilóide (CITRON, 2010; HOLMES et al., 2008).

Em uma correspondência à *Nature* Medicine, El Khoury (2010) escreveu: "*Qualquer esforço que planeje melhorar o diagnóstico ou o tratamento da neurodegeneração deveria incluir uma discussão sobre o sistema neuroimune para ser compreensivo*".

Outros autores também compartilham a mesma opinião. Para Haass (2010), a Doença de Alzheimer será mais bem compreendida se abordada de uma forma integrada, levando em consideração a neurodegeneração, condições vasculares e a inflamação (HAASS, 2010). Lang (2010) acredita que testes clínicos e os novos tratamentos também devam focar em todos os aspectos da doença, incluindo a neuroinflamação (LANG, 2010).

### 2.4.2 Inflamação na Doença de Alzheimer – Sistema Nervoso Central e periferia

Como relatado anteriormente, além das placas amilóides e dos emaranhados neurofibrilares, a neuroinflamação também vem sendo muito descrita na Doença de Alzheimer. Com a exceção de poucos trabalhos, como aqueles que utilizam tomografia por emissão de pósitrons, a avaliação de neuroinflamação em doenças neurodegenerativas humanas tem sido realizada em estudos *post-mortem*. Neste sentido, Vehmas et al. (2003), detectaram que o aparecimento de placas amilóides estava relacionado com maior quantidade de microglia ativada. Os autores acreditam que a ativação da microglia deva ser um evento inicial na Doença de

Alzheimer e que a resposta imunológica no cérebro possa contribuir para o dano neuronal (VEHMAS et al., 2003).

A microglia fornece suporte e representa a primeira e principal forma de resposta imunológica no cérebro. Ela pode ter funções protetoras (como funções fagocíticas), assim como efeitos deletérios, neurotóxicos. A ativação da microglia resulta em aumento na expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC) II e liberação de mediadores pró-inflamatórios (LEE et al., 2010).

Na Doença de Alzheimer, o papel exato da microglia é desconhecido. Ele poderia ser benéfico (na medida em que a microglia fosse capaz de fagocitar e retirar peptídeos β-amilóides de placas senis) (BOISSONNEAULT et al., 2009), ou prejudicial (já que essas células produzem mediadores pró-inflamatórios que levariam à degeneração neuronal) (LUCIN; WYSS-CORAY, 2009). A maioria dos trabalhos da literatura confere um papel patológico à microglia (LUCIN; WYSS-CORAY, 2009).

A ativação da microglia na Doença de Alzheimer resulta em aumento de citocinas (produzidas principalmente por essas células, mas também por astrócitos). A interleucina-1 (IL-1) talvez seja a citocina mais estudada em desordens neurodegenerativas, incluindo o Alzheimer (SPULBER; SCHULTZBERG, 2010). A produção de fatores inflamatórios, incluindo a IL-1, parece ser decorrente da reação da microglia ao peptídeo amilóide (DEL BO, et al., 1995). Além da IL-1, outros mediadores inflamatórios também são produzidos pela microglia (a princípio em resposta ao peptídeo): óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, TNF-α, IL-6, IL-18 e prostaglandina E2 também se encontraram aumentados no cérebro de pacientes de Alzheimer (AKIYAMA et al., 2000).

Além do dano neuronal induzido pelos mediadores inflamatórios, também se discute se a microglia teria um papel direto na deposição de peptídeos β-amilóide. Em um estudo temporal em camundongos transgênicos, foi demonstrado, através de microscopia com multi-foton, que a formação da placa senil precede o acúmulo de microglia ao redor das placas (MEYER-LUEHMANN et al., 2008). Isso sugere que a microglia não participe da formação da placa, ao menos em fases iniciais. Além disso, nesse trabalho não se observou *clearance* das placas pela microglia (MEYER-LUEHMANN et al., 2008).

Por outro lado, a ativação da microglia em resposta ao peptídeo β-amilóide pode resultar em produção de espécies reativas de oxigênio (como descrito

anteriormente), que por sua vez, é capaz de promover a formação de mais peptídeo β-amilóide (KERN; BEHL, 2009). De forma semelhante, Del Bo et al. (1995), demonstraram que IL-1β e IL-6 induziram aumento na expressão da APP em culturas primárias de neurônios corticais. Portanto, acredita-se que a produção de β-amilóide induziria ativação da microglia, resultando em produção de mediadores inflamatórios, que causariam dano neuronal e aumentariam a produção de β-amilóide, amplificando a lesão tecidual (LEE et al., 2010). Dessa forma, a ativação da microglia, ao menos indiretamente, poderia agravar a β-amiloidogênese.

A microglia parece ter outro papel na patogênese da Doença de Alzheimer: a progressão das placas difusas (placas mais amorfas, com bordos pouco definidos) em placas neuríticas (placas com características mais fibrilares, cercadas por neuritos distróficos). Essa progressão parece ser modulada pela microglia, como demonstrado em camundongos transgênicos $APP_{SW}$ (Tg2567) que expressam o gene mutante da APP humana (WEGIEL et al., 2001).

Astrócitos, células abundantes no cérebro que desempenham diversas funções nesse tecido, também produzem mediadores inflamatórios em resposta ao peptídeo β-amilóide, e aos mediadores oriundos da microglia. O resultado é a amplificação da resposta ao peptídeo, aumentando a neuroinflamação e neurodegeneração (LEE et al., 2010).

Somando-se essas descobertas com a observação de que o uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais reduz o risco de desenvolvimento e progressão de Alzheimer, o papel da neuroinflamação como agravador da patogenia é bem aceito na literatura atual (AKIYAMA et al., 2000). Ainda, acredita-se que aqueles indivíduos idosos dotados de maior resposta inflamatória (alteração que pode ocorrer com o envelhecimento, denominada de *inflammaging*) (FRANCESCHI et al., 2007) apresentem maior risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer e para progressão mais rápida da doença, quando estabelecida (GIUNTA et al., 2008).

A neuroinflamação também está presente nos modelos animais para a Doença de Alzheimer. Nos camundongos 3×Tg-AD, a expressão de Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1, do inglês *Monocyte chemotactic protein*) estava aumentada em regiões corticais aos seis meses de idade, momento em que se detectou acúmulo de β-amilóide intracelular (JANELSINS et al., 2005). Como o aumento dos níveis desses mediadores ocorreu somente em regiões corticais e não no hipocampo (onde também foi encontrado β-

amilóide intraneuronal) e deu-se de forma progressiva, a ocorrência de inflamação parece depender da região analisada e constituir um processo crônico (JANELSINS et al., 2005). Os níveis de CCR6 (receptor da quimiocina CCL20) também estavam aumentados em células mononucleares de cérebros de camundongos 3xTg-AD à partir de 6 meses de idade (SUBRAMANIAN et al., 2010).

Da mesma forma que em humanos, a expressão de mediadores inflamatórios parece influenciar a patogenia em camundongos transgênicos: a indução da expressão de TNF-α no cérebro de camundongos 3xTg-AD aumentou a quantidade de peptídeo β-amilóide e proteína tau e de microglia ativada, assim como morte neuronal (JANELSINS et al., 2008).

Perifericamente, alterações em citocinas também foram detectadas em pacientes com Alzheimer. A literatura contempla resultados contraditórios dessas alterações; alguns trabalhos encontraram aumentos, outros diminuição, numa variedade de citocinas. Segundo uma revisão de Lee et al. (2009), as principais citocinas e quimiocinas cujos níveis circulantes apresentaram-se alterados são: IL-1β, IL-4, IL-10, IL-6, IL-12, IL-16, IL-18, TNF-α, TGF-β e MCP-1 (LEE et al., 2009).

Na tentativa de identificar possíveis biomarcadores plasmáticos, Ray et al. (2007) identificaram 18 proteínas, cujas concentrações alteradas poderiam predizer um diagnóstico de Alzheimer, com uma acurácia de aproximadamente 90%. Biologicamente, essas proteínas parecem estar envolvidas em processos hematopoiéticos e apoptóticos e em respostas imunológicas (RAY et al., 2007). Posteriormente, Gomez Ravetti e Moscato (2008) observaram que desses 18 biomarcadores, 5 poderiam identificar indivíduos com Alzheimer (facilitando o diagnóstico): IL-1α, IL-2, EGF (do inglês *epidermal growth factor*, fator de crescimento epidermal), TNF- α e G-CSF (do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*, fator estimulador de colônias de granulócitos) (GOMEZ RAVETTI; MOSCATO, 2008). É interessante notar que dessas 5 proteínas, 4 são citocinas pró-inflamatórias (IL-1α, IL-2, TNF- α e G-CSF) (EL KHOURY, 2010a; GOMEZ RAVETTI; MOSCATO, 2008).

Alterações imunológicas periféricas poderiam influenciar a patogenia no cérebro do paciente de Alzheimer. Citocinas circulantes poderiam atravessar a barreira hematoencefálica e ativar a microglia e astrócitos, aumentando ainda mais a produção de mediadores inflamatórios (MCNAULL et al., 2010).

Maiores níveis periféricos de proteína reativa-C (uma proteína de fase aguda) foi relacionada com maior risco de desenvolvimento de Alzheimer e maiores déficits cognitivos (MCNAULL et al., 2010). Além disso, outras doenças relacionadas ao envelhecimento, como diabetes *mellitus*, aterosclerose, artrite e câncer, também são caracterizadas por um estado de inflamação crônica (CHUNG et al., 2009). Diabetes *mellitus* é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de Alzheimer e especula-se que a inflamação possa ser um dos mecanismos de intersecção entre essas doenças (HAN; LI, 2010). Hiperlipidemia e obesidade (síndromes metabólicas também associadas à aumento de marcadores inflamatórios) também são fatores de risco para Alzheimer (MCNAULL et al., 2010).

Alterações imunológicas nos camundongos 3×Tg-AD também foram descritas. Gimenez-Llort et al. (2008) verificaram que algumas alterações imunológicas relacionadas à idade (imunossenescência) encontravam-se exacerbadas nos camundongos 3×Tg-AD, como maior secreção de TNF-α por linfócitos do baço. Segundo os autores, isso evidenciaria uma imunossenescência prematura dos camundongos 3xTg-AD, que favoreceria maiores taxas de morbidade e mortalidade, encontradas nesses camundongos (GIMENEZ-LLORT et al., 2008).

Outro trabalho demonstrou alterações nos níveis de citocinas esplênicas de camundongos 3xTg-AD, após estimulação: foi detectado maior produção de IL-6, IL-2 e IL-13 e diminuição de IL-10 por linfócitos T, quando comparado aos camundongos Wild Type (SUBRAMANIAN et al., 2010).

Poucos trabalhos estudaram a relação entre as alterações imunológicas no SNC e na periferia em modelos animais da Doença de Alzheimer. Subramanian et al. (2010) verificaram um aumento de um mediador inflamatório no SNC e na periferia, que poderia servir como biomarcador da doença em camundongos 3xTg-AD. Foi encontrado aumento de CCR6 (o receptor para a quimiocina CCL20) tanto no cérebro quanto no baço. Em camundongos 3xTg-AD fêmeas, esse aumento ocorreu tanto em animais jovens, como nos idosos (motivo pelo qual se discutiu o potencial de CCR6 como biomarcador). Em machos, esse aumento ocorreu apenas nos animais jovens. O aumento de CCR6 nos tecidos cerebral e periférico em camundongos jovens sugere que um processo inflamatório esteja presente mesmo antes do aparecimento da sintomatologia, ou seja, de déficits cognitivos (SUBRAMANIAN et al., 2010).

Apesar das inúmeras tentativas em se encontrar biomarcadores periféricos para a Doença de Alzheimer, a relação entre inflamação periférica e inflamação central nesta doença permanece desconhecida (LUCIN; WYSS-CORAY, 2009): não se sabe o que ocorre primeiro, e nem se a inflamação no SNC poderia influenciar respostas imunológicas periféricas e vice-versa (LEE et al., 2009).

Inserido no grupo de neuroimunologia, este trabalho pretendeu investigar alterações inflamatórias no cérebro de camundongos 3xTg-AD e suas conseqüências no sistema imune periférico. Assim como em humanos, o camundongo 3xTg-AD utilizado neste estudo apresenta depósitos de peptídeo β-amilóide no cérebro e ativação da microglia, com aumento de mediadores inflamatórios no tecido neuronal (até o presente momento, descrito no córtex ento-rinal). Porém, não se sabe se, nesses camundongos, essas alterações inflamatórias centrais são acompanhadas de alterações imunológicas periféricas. Além disso, a constatação de que a imunossenescência induz à uma resposta inflamatória exacerbada a alguns estímulos infecciosos (devido à neuroinflamação basal dos idosos) nos faz acreditar que alterações inflamatórias no cérebro de camundongos 3xTg-AD possam influenciar parâmetros imunológicos na periferia.

# 3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estudar a relação entre mediadores inflamatórios periféricos e a neuroinflamação, e suas implicações em camundongos 3×Tg-AD, um modelo animal para a Doença de Alzheimer.

## 3.1 Objetivos específicos

Neste trabalho, avaliou-se como alterações de citocinas no SNC e na periferia interagem temporalmente e como essas alterações podem influenciar outros aspectos da imunidade nos camundongos 3×Tg-AD. Além disso, avaliou-se o fenótipo comportamental e a patogenia do peptídeo β-amilóide no cérebro desses camundongos, como validação do modelo em si. Para tanto, os seguintes experimentos foram realizados:

1. Avaliação do fenótipo comportamental:

a) Avaliação da memória espacial no Labirinto de Barnes

b) Avaliação de comportamento semelhante à ansiedade na caixa claro-escuro

c) Avaliação da locomoção e habituação em Campo Aberto (CA)

2. Avaliação temporal, descritiva, de peptídeo β-amilóide no SNC.

3. Avaliação temporal de IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α e IL-10 no sangue.

4. Avaliação temporal de IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α e IL-10 e de corticosterona no sangue e expressão de IL-1β e IL-6 e no hipocampo, e de outros parâmetros periféricos.

5. Efeitos da administração de LPS em camundongos 3xTg-AD de 12 meses de idade:

a) na produção de citocinas periféricas (IL-6, MCP-1, TNF-α, IL-10, IL-12p70 e INF-γ) e no hipocampo (IL-1β e IL-6)

b) nos níveis de corticosterona sérica

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

Serão descritos o material e métodos utilizados neste trabalho.

## 4.1 Animais

Foram utilizados aproximadamente 80 camundongos 3×Tg-AD (grupo experimental) e 80 camundongos WT (*wild type*, grupo controle) ambos de background C57b/129, machos, criados no biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Os animais foram alojados em grupos de 3 a 6 por caixa plástica (16 x 28 x 13 cm) sob temperatura (22±4°C), luz (7:00h-19h) e umidade (45 – 65%) controladas, com acesso *ad libitum* a ração e água. As caixas continham maravalha auto-clavada e foram limpas semanalmente.

## 4.2 Soluções e Reagentes

Anticorpo monoclonal para peptídeo β-amilóide/ e ou proteína APP mutante humana (6E10 SIGNET - COVANCE): o anticorpo primário foi diluído 1000 vezes em triton normal e soro normal de cabra.

Anticorpo secundário: SuperPicture™ Kit (HRP, Broad Spectrum), Life Technologies™.

Fixador: solução de paraformaldeído 4% diluído em Tampão fosfato 0,1M.

Lipopolissacarídeo: LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 0127:B6; Sigma-Aldrich®) foi utilizado na dose 200 µg/kg (diluído em solução salina 0,9% estéril), em diluição de 20 µg/mL.

Resina para lâminas: Permount™, Fisher Scientific.

Sacarose 30%: solução de sacarose 30% diluída em Tampão fosfato 0,1M.

Solução anti-congelante: solução de sacarose 30% diluída em Tampão fosfato 0,1M e etileno-glicol.

Solução de revelação: 100mg de DAB (diaminobenzidina), 1mL de DMSO (dimetilsulfóxido), 1mL de peróxido de hidrogênio 6% e 98mL de tampão fosfato 0,1M.

Solução para incubação de anticorpo primário: BSA (albumina sérica bovina) 1%, Triton 0,3% em tampão fostato 0,1M.

Tampão Fosfato 0,1M.

Triton normal 0,3%, diluído em tampão fosfato.

Xilol P.A., Synth.

## 4.3 Procedimentos

Serão descritos os procedimentos realizados no presente trabalho.

### 4.3.1 Coleta de tecidos e tratamentos

A avaliação do peptídeo β-amilóide no cérebro (experimento 2) foi realizada através de imunohistoquímica (descrita adiante). Os animais foram profundamente anestesiados com xilazina (Rompun®, Bayer) e cloridrato de ketamina (Dopalen injetável®, Agrigrands), por via intraperitoneal, nas doses de 30 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de ketamina. Seguiu-se a perfusão trans-cardíaca com 25 mL de solução salina tamponada (PBS), e então com 100 mL de fixador 4%. Os cérebros foram removidos e armazenados no mesmo fixador por no mínimo 5 horas, e então em solução de sacarose 30% até que estivessem saturados com a solução e afundassem no recipiente. Os cérebros foram congelados e cortados em micrótomo na espessura de 30µm. Os cortes foram temporariamente armazenados na solução de sacarose 30% e então, mantidos em freezer -80°C, imersos em solução anti-congelante.

A coleta de sangue para o experimento 3 foi realizada por punção da veia sub-mandibular para obtenção de pequeno volume sanguíneo (150 µL). As amostras

de sangue foram centrifugadas à 200 x g por 15 minutos, para obtenção de soro. O soro foi armazenado em freezer -80°C até a dosagem de citocinas.

A coleta de sangue para o experimento 4 foi realizada através de decapitação. O soro foi obtido e armazenado de forma semelhante ao experimento 3. Para o experimento 4 também foram coletados adrenais, baço, fígado e timo. Os órgãos periféricos foram pesados em balança analítica.

Neste experimento (4), a coleta de tecido cerebral também foi realizada. Coletou-se o hipocampo através de microdissecção guiada por lupa (Figura – 3). A coleta foi realizada com material cirúrgico estéril e limpo com solução de RNAse free (Invitrogen®). O cérebro foi mantido resfriado sobre uma placa de petri contendo gelo seco, e a coleta não ultrapassou 10 minutos. O hipocampo foram armazenado em criotubos RNAse free, rapidamente congelado em nitrogênio líquido, e então mantido em freezer -80°C até a extração de RNA mensageiro.

Figura 3 – Exemplo de microdissecção de hipocampo. À esquerda, cérebro sem o córtex do hemisfério direito. À direita, hipocampo microdisseccionado. A figura é representativa de uma microdissecção do hipocampo. O cérebro da figura encontrava-se fixado em paraformol 4%. Para a obtenção do hipocampo no experimento 4, utilizou-se o tecido a fresco, sem fixação.

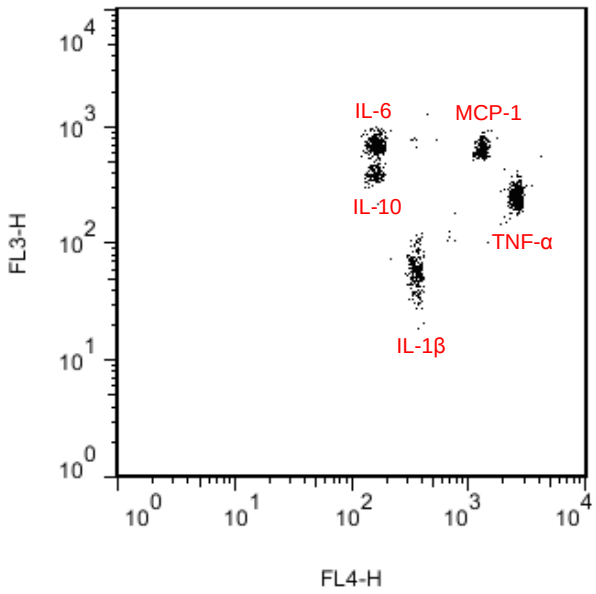
Os animais destinados ao experimento 5 foram tratados por via intraperitoneal, com salina ou LPS, em volume de 1% do seu peso (TUKEL et al.,

2009), na dose de 200µg/kg. Três horas após os tratamentos, os animais foram sacrificados por decapitação, para obtenção de sangue (para dosagem de citocinas e corticosterona) e coleta de hipocampo (para avaliação da expressão de citocinas). Os procedimentos para a coleta de soro e hipocampo foram idênticos aos do experimento 4.

### 4.3.2. Avaliação de citocinas periféricas – Citometria de Fluxo (Cytometric Bead Array)

As citocinas/ quimiocinas analisadas no soro foram: IL-1β, lL-6, IL-10, TNF-α, MCP-1 para os experimentos 3 e 4. O teste foi realizado com um kit para camundongos (Flex Kit, BD$^{TM}$ Cytometric Bead Array, CBA). Para o experimento 5, além das citocinas supra citadas (exceto a IL-1β), também foram avaliados os níveis de INF-γ e IL-12p70. Neste experimento, foi utilizado outro kit para camundongos, o *Mouse inflammation kit*, BD$^{TM}$, CBA. Os kits consistem em 5 (ou 6) tipos de micro-esferas, de tamanhos distintos, revestidas com anticorpos para proteínas de IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, MCP-1, IL-12p70 e INF-γ (Figura – 4). As micro-esferas (revestidas com os anticorpos de detecção), os padrões, as amostras e o reagente de detecção conjugado com PE (ficoeritrina) foram incubados, formando complexos. A aquisição dos dados foi feita em citômetro de fluxo. A análise foi realizada através do sotftware de análise BD$^{TM}$ CBA, no canal de fluorescência FL-2 (vermelho). A curva padrão para cada proteína abrange concentrações variando entre 10 e 2500 pg/mL.

Figura 4 – Dot plot de beads das citocinas avaliadas por citometria de fluxo




4.3.3 Avaliação de citocinas centrais - RT-PCR

A expressão do RNA mensageiro das citocinas IL-1β e IL-6 foi avaliada. Os cérebros foram coletados como descrito anteriormente.

O tecido foi processado para extração do RNA com o Kit para extração de RNA *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE). Cerca de 30 mg de hipocampo foi adicionado em 350 µL da solução de lise RA1 do *kit*, acresdido de 3,5 mL de β-mercaptoetanol. O tecido foi macerado com o auxílio de um pistilo autoclavado e RNAse-free. A mistura foi transferida para colunas de extração, seguindo instruções do fabricante. Basicamente, o tecido foi colocado em colunas de extração que retiveram o RNA, que foi lavado e purificado com uma seqüência de reagentes. Na última etapa, o reagente promoveu a liberação do RNA da coluna, e as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o uso.

Uma alíquota de 10 µL foi retirada para a quantificação do RNA e verificação de sua integridade. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em 60V por 1,5 hora. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio para a visualização das bandas em luz UV. A quantificação foi realizada em biofotômetro (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) a 260/280 nm. Amostras numa

variação de 1,7 até 2,0 ng/mL indicaram baixa contaminação do RNA, sendo consideradas de boa qualidade para a transcrição reversa.

O DNA correspondente (cDNA) foi obtido em ensaio de transcrição reversa (RT), utilizando-se Oligo DT®, dNTPs e a enzima Superscript II ® (Invitrogen®), conforme instruções do fabricante. Após a transcrição reversa (RT), foi efetuado o PCR em Tempo Real (ABIPrism® 7000 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems). O sistema TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems ®) foi adotado para a detecção da expressão gênica. Os *primers* específicos para os genes de IL-1β (Mm99999061_mH), IL-6 (Mm00446191_m1) e o controle endógeno 18S (4352930E) foram confeccionados pela empresa Applied Biosystems®. Para interpretação dos resultados obtidos no sistema de Real Time PCR foi utilizado o método comparativo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para a quantificação relativa.

### 4.3.4 Análise dos níveis de peptídeo β- amilóide no cérebro - Imunohistoquímica

A presença de peptídeo β-amilóide total foi identificada através de imunohistoquímica.

Os cortes foram descongelados e lavados em tampão fosfato (3 vezes por 10 minutos cada). Procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena, através de lavagem em peróxido de hidrogênio 0,3%. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário (6E10), na diluição 1:1000 em solução de BSA 1% e Triton 0,3%. Após cerca de 12 horas, os cortes foram novamente lavados em tampão fosfato (3 vezes por 10 minutos cada) e incubados com anticorpo secundário por 20 minutos, seguindo nova lavagem com tampão fosfato (3 vezes por 10 minutos cada). A revelação foi realizada com DAB: os cortes foram imersos em solução de DAB por 1 minuto e 30 segundos. Os cortes foram então lavados (3 vezes por 10 minutos cada), e montados em lâmina. As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70, 90 e 100%), imersas em xilol e cobertas com lamínulas com solução de Permount™.

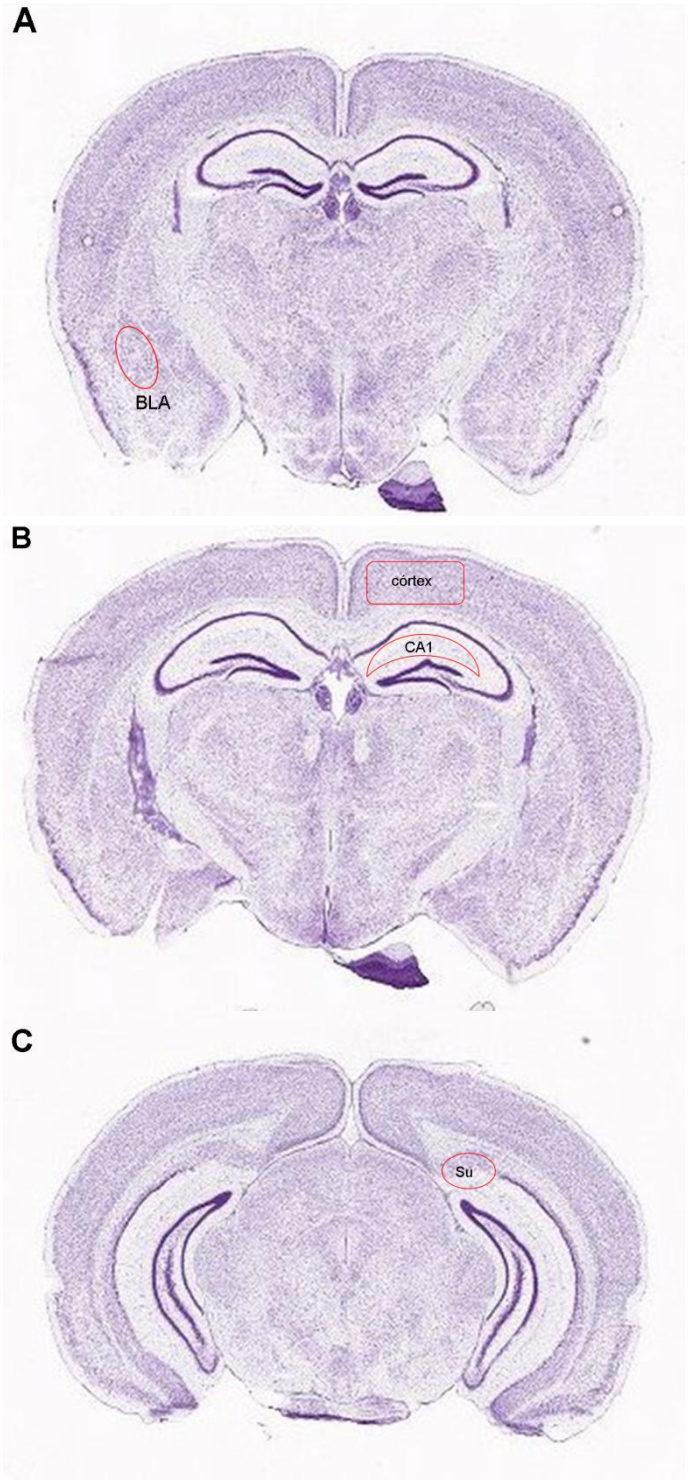
As marcações para o anticorpo 6E10 foram avaliadas na amígdala basomedial: entre -1,70 e -1,22mm pos Bregma, no córtex: entre -2,06 e -1,70mm

post Bregma; na região CA1 do hipocampo: entre -2,06 e -1,70mm post Bregma; e no subículo (pertencente à formação hipocampal): entre -3,08 e -2,80mm.

O anticorpo primário utilizado (6E10) liga-se em epítopos localizados nos aminoácidos 3 a 8 da porção terminal amina da sequência do peptídeo β-amilóide. Isso significa que pode ligar-se tanto à proteína APP inteira, quanto ao peptídeo livre. Desta forma, neste trabalho, a detecção da proteína APP e/ou do peptídeo β-amilóide através do anticorpo 6E10 será descrita como “marcação positiva para o anticorpo 6E10” ou derivações semelhantes.

A figura – 5 demonstra as regiões avaliadas para a presença de peptídeo β-amilóide.

Figura 5 – Representação esquemática das regiões utilizadas para análise da presença de petídeo β-amilóide. [A] Esquema da amígdala basolateral (BLA). [B] Esquema do córtex e da região CA1 do hipocampo. [C] Esquema do subículo (Su).




4.3.5 Avaliação dos níveis séricos de corticosterona – Ensaio imuno-enzimático

As amostras de soro foram descongeladas em temperatura ambiente e a corticosterona foi mensurada através do kit comercial *Corticosterone EIA Kit* – DetectX – Arbor Assays®, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, os padrões (fornecidos no kit) e as amostras diluídas foram pipetadas em placas de 96 poços cobertos com anticorpo de captura. Um conjugado corticosterona-peroxidase foi adicionado aos padrões e às amostras em cada poço. A reação de ligação foi iniciada através da adição de anticorpo policlonal contra corticosterona em cada poço. Após 1 hora de incubação a placa foi lavada e foi adicionado o substrato para peroxidase em cada poço. A solução de parada foi adicionada e a intensidade de coloração foi analisada em espectofotômetro com filtro de 450nm.

### 4.3.6 Aparatos comportamentais e procedimentos

Serão descritos os aparatos utilizados para avaliação do comportamento e os procedimentos em cada aparato.

#### *4.3.6.1 Avaliação da memória espacial no Labirinto de Barnes (LB)*

O LB foi desenvolvido por Barnes (1979) e consiste de um labirinto não aquático, útil para testar memória espacial em ratos e camundongos (SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010).

Neste estudo, o teste do LB (REISERER et al., 2007) consistiu de um labirinto circular (90cm de diâmetro), elevado 40cm do chão, sem paredes, e com 12 furos (5cm de diâmetro) igualmente distribuídos sobre seu perímetro (5cm da borda). O labirinto foi igualmente iluminado por luz ambiente branca fluorescente (aproximadamente 20lux). Em um dos furos (furo “alvo”), uma caixa de escape foi encaixada, de forma que os animais não a vissem do centro do labirinto. Os outros furos foram posteriormente nomeados de furos “não alvo”. Dicas visuais distantes

(figuras geométricas coloridas) foram penduradas nas paredes, e o experimentador (o mesmo para todo o experimento) permaneceu sempre no mesmo local.

Cada camundongo foi introduzido no centro do labirinto, com o auxílio de uma caixa circular (opaca, de 10cm de diâmetro), a “caixa de início”, para assegurar uma posição inicial aleatória. Após 10 segundos, a “caixa de início” foi removida e o teste teve início. Permitiu-se que o camundongo explorasse o labirinto por 3 minutos. O final do teste ocorreu no momento em que o camundongo entrou no furo “alvo”, ou após decorridos 3 minutos. Depois da entrada do camundongo no furo “alvo”, o mesmo foi coberto para evitar a reentrada do animal. Camundongos que não encontraram e não entraram no furo “alvo” no período de 3 minutos foram gentilmente guiados até ele pelo experimentador. Quatro treinamentos (T1-T4) por dia foram aplicados, com 15 a 20 minutos de intervalo entre treinos, durante quatro dias consecutivos (D1-D4). No quinto dia, um teste prova (TP) foi aplicado, 24 horas após o último treinamento. No TP, a caixa de escape foi removida e permitiu-se que os camundongos procurassem o furo “alvo” durante 90 segundos. Todos os testes foram filmados e analisados posteriormente com o auxílio do programa Ethovision (Noldus Information Technology, Utrecht, The Netherlands).

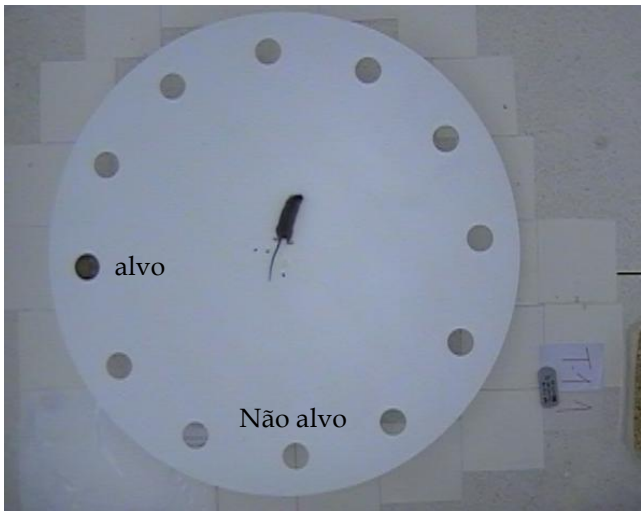
Para evitar que os camundongos utilizassem dicas olfativas, o labirinto foi limpo com uma solução de álcool 10% e rotacionado 90° graus após cada teste, mantendo a caixa de escape no mesmo local (de acordo com as dicas visuais).

Muitos estudos utilizam estímulos aversivos (como barulho) para estimular os camundongos a encontrar o furo “alvo”. Entretanto, Harrison et al. (2006) demonstraram que isso não é mandatório, uma vez que os camundongos encontram-se motivados a encontrar a caixa de escape na ausência de estímulos aversivos (HARRISON et al., 2006). Portanto, optamos não usar estímulo aversivo neste teste, exceto pela iluminação ambiente.

Como observado previamente (HARRISON et al., 2006; REISERER et al., 2007), muitos camundongos não entravam no furo “alvo” após encontrá-lo pela primeira vez. Assim, avaliamos o número de deflexões de cabeça em furos “não alvo” antes que o camundongo encontrasse o furo “alvo” (erros primários) e a latência para encontrar o furo “alvo” pela primeira vez (latência primária). Também avaliamos a distância e velocidade empregadas até que o camundongo encontrasse o furo “alvo”, nomeando estes parâmetros como distância primária e velocidade primária, respectivamente. Entre o momento em que o camundongo encontrou o

furo “alvo” até o final do teste (ou seja, após 3 minutos de treino, ou quando o camundongo entrava na caixa de escape, ou 90 segundos para o teste prova) o número de deflexões de cabeça em furos “não alvo” (erros secundários) e a distância percorrida (distância secundária) foram avaliadas. No TP, avaliamos o número de deflexões de cabeça em cada furo (“alvo” e “não alvo”). A Figura 6 ilustra o Labirinto de Barnes.

Figura 6 – Labirinto de Barnes, com furo alvo e representação de um furo não alvo




*4.3.6.2 Avaliação de comportamento semelhante à ansiedade na Caixa Claro Escuro (CCE)*

A CCE consistiu de uma caixa de acrílico com dois compartimentos: um escuro, pequeno (9 x 10cm) e um claro, maior (18 x 10cm). Os compartimentos foram divididos por uma porta (5 x 3cm), por onde os camundongos podiam atravessar.

Os camundongos foram individualmente posicionados no compartimento claro, em direção à parede, permitindo que explorassem o aparato por 5 minutos.

Foi avaliado: a latência para entrar no compartimento escuro (latência para escuro), o tempo gasto no compartimento claro, o número de entradas no escuro e o

número de acesso de risco realizado pelos camundongos do compartimento claro, para o escuro.

*4.3.6.3 Avaliação da locomoção e habituação em Campo Aberto (CA)*

O teste de Campo Aberto consistiu de uma arena circular, de 40cm de diâmetro e com paredes de 20cm, que foi virtualmente dividida em três regiões: central, intermediária e tigmotáxica (a área adjacente à parede do CA).

Os camundongos foram introduzidos no centro do CA e permitiu-se que os mesmos explorassem o aparato por 5 minutos. Os camundongos foram testados no CA durante 4 dias consecutivos (D1-D4). Entre cada observação, o aparato foi limpo com solução de álcool 5%.

Os parâmetros avaliados incluíram: locomoção (cm) e latência para atingir a zona tigmotáxica (segundos).

## 4.4 Delineamento experimental

Será descrito o delineamento experimental utilizado neste trabalho.

### 4.4.1 Experimento 1: Avaliação do fenótipo comportamental

Neste experimento foram utilizados 9 camundongos Wild Type e 13 camundongos 3xTg-AD. Os mesmos camundongos foram submetidos ao Labirinto de Barnes e à Caixa claro-escuro aos 4, 6 e 12 meses de idade, conferindo um delineamento longitudinal ao estudo. Um grupo adicional de camundongos de 6 meses de idade (n=9 para cada genótipo) foi avaliado no Campo Aberto.

### 4.4.2 Experimento 2: Avaliação temporal, descritiva, de peptídeo β-amilóide no SNC

A avaliação do peptídeo β-amilóide no SNC foi realizada em camundongos de 4, 6, 8 e 12 meses de idade (n=5 animais, por idade e por grupo).

### 4.4.3 Experimento 3: Avaliação temporal de IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α e IL-10 no sangue

A avaliação de citocinas e corticosterona séricas foi realizada nos mesmos animais (n=10 por grupo), aos 4, 5, 6, 7 e 8 meses de idade.

### 4.4.4 Experimento 4: Avaliação temporal e de IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α e IL-10 e de corticosterona no sangue e expressão de IL-1β e IL-6 no SNC, e de outros parâmetros periféricos

Neste experimento, foram utilizados camundongos de 4, 6, 8 e 12 meses de idade (n=8 a 10 animais, por idade e por grupo). No sangue foram dosadas citocinas (IL-1β, lL-6, MCP-1, TNF-α e lL-10) e corticosterona. A expressão de IL-1β e lL-6 foi avaliada no SNC.

### 4.4.5 Experimento 5: Efeitos da administração de LPS em camundongos 3xTg-AD de 12 meses de idade

Devido à limitação no número de animais disponíveis, neste experimento priorizou-se a utilização de camundongos de 12 meses de idade, já que entre as idades selecionadas, nesta haveria maior quantidade de peptídeo β-amilóide cerebral, e, portanto, maior probabilidade de alteração na resposta central e periférica ao LPS.

Para este experimento foram utilizados camundongos de 12 meses de idade (n=8 a 10 animais, por grupo).

Os animais foram tratados com LPS ou salina, e sacrificados por decapitação 3 horas após os tratamentos. As coletas foram realizadas entre 8:00 e 10:00h.

Segue, em seqüência, o quadro 1 com a representação dos experimentos, idade dos animais e procedimentos.

Quadro 1 – Representação esquemática das idades dos animais e procedimentos, em cada experimento

| Experimento | Idade dos animais | Procedimentos/Análises |
|---|---|---|
| 1 | 4, 6 e 12 m<br>(longitudinal, exceto CA)<br>N=9 a 13 | a) LB<br>b) CCE<br>c) CA (grupo adicional de 6m) |
| 2 | 4, 6, 8 e 12m<br>N=5 | IHQ: peptídeo β-amilóide |
| 3 | 4, 5, 6, 7 e 8m<br>(longitudinal)<br>N=10 | CBA: citocinas séricas |
| 4 | 4, 6, 8 e 12m<br>N=8 a 10 | CBA: citocinas séricas<br>ELISA: corticosterona sérica<br>RT-PCR: citocinas centrais (N=5)<br>Pesagem de órgãos periféricos |
| 5 | 12m<br>N=8 a 10 | a) CBA: citocinas séricas<br>RT-PCR: citocinas centrais (N=5)<br>b) ELISA: corticosterona sérica |

## 4.5 Análise Estatística

Dados que passaram pelos testes de normalidade e homocedasticidade foram analisados por testes paramétricos: teste t de Student ou ANOVA de 1 via. Teste t foi utilizado para análises entre dois grupos (controle e experimental) em que a idade não foi considerada. ANOVA de 1 via, seguida de teste de comparações múltiplas de Dunnett, foi utilizada quando uma variável foi avaliada em mais de dois grupos. ANOVA de 2 vias, seguida de pós teste de Bonferroni, foi utilizada quando dois fatores foram considerados. ANOVA de 2 vias de medidas repetidas, seguida de pós teste de Bonferroni, foi utilizada quando medidas dos mesmos sujeitos experimentais foram analisadas em idades diferentes. ANOVA de 3 vias, seguida de pós teste de Bonferroni, foi utilizada quando os fatores genótipo, idade e tempo (dias) foram avaliados. Teste de Mann-Whitney e teste de Friedman foram utilizados

para dados não paramétricos, como alternativa para teste t e ANOVA de 1 via, respectivamente.

# 5 RESULTADOS

Os resultados serão descritos separadamente, no respectivo experimento.

## 5.1 Experimento 1: Avaliação da memória espacial no Labirinto de Barnes e de comportamento semelhante à ansiedade na caixa claro-escuro

Serão descritos os resultados da memória espacial no Labirinto de Barnes

### 5.1.1 Labirinto de Barnes

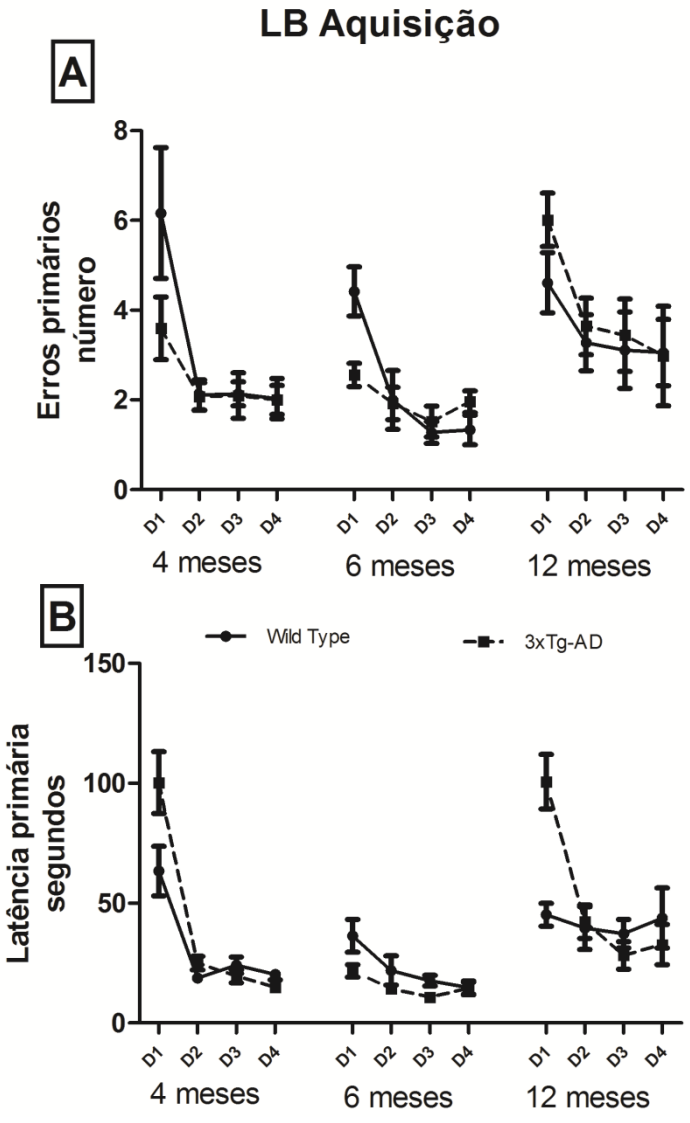
Neste experimento, avaliamos a memória espacial de camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de forma longitudinal, aos 4, 6 e 12 meses de idade. Como descrito, os animais foram treinados no labirinto durante 4 dias consecutivos D1-D4, em um total de 4 treinos por dia (T1-T4), mantendo-se sempre as mesmas configurações espaciais. Vinte e quatro horas após o último treino, os animais foram submetidos ao Teste Prova, no qual a caixa de escape foi retirada. A seguir segue descrição dos resultados obtidos durante os dias de treino. Devido à complexidade na representação da ANOVA de 3 vias, as significâncias serão tratadas somente no texto e nas legendas das figuras.

A primeira variável analisada foi o número de erros primários. Houve um efeito do dia neste parâmetro, indicando que os erros primários diminuíram ao longo dos treinos: foram maiores no D1, comparado com todos os outros dias, em todos os grupos. Além disso, houve um efeito da idade neste parâmetro, demonstrando que, independente do genótipo, houve um aumento relacionado à idade no número de erros primários, que iniciou aos 12 meses de idade (Figura – 7A).

Com relação à latência primária, houve uma interação entre genótipo x dia x idade, que parece ser parcialmente devido à diferenças na idade e à diferenças nos dias (já que a latência primária foi maior no D1, comparado com todos os outros dias). A latência primária diminuiu ao longo dos testes para todas as idades, porém aos 4 e 12 meses, camundongos 3xTg-AD demoraram mais para encontrar o furo

"alvo" no D1, (a latência primária no D1 para estes camundongos foi maior) (Figura 7B).

Figura 7 – Labirinto de Barnes: Erros primários e latência primária durante testes de treinamento. **(A)** ANOVA de 3 vias demonstrou que houve um efeito do dia no número de erros primários ($F_{3,240}$=18.98, p<0,001; Fig. 16A), independente do genótipo e da idade. Pós teste de Bonferroni demonstrou que os erros no D1 foram maiores comparado com todos os outros dias (p<0,05 para todos), em todos os grupos. Também houve um efeito da idade ($F_{2,240}$=13,781, p<0,001). Pós-testes demonstraram que camundongos de 12 meses de idade diferiram de camundongos de 4 (p<0,01) e de 6 meses (p<0,001), independente do genótipo. **(B)** ANOVA de 3 vias demonstrou uma interação entre genótipo x dia x idade ($F_{6,240}$=3.96, p<0,01). Pós testes demonstraram que essa interação é parcialmente devido à diferenças na idade (p<0,01 para todas as comparações), e também à diferenças nos dias (D1 diferiu de todos os outros dias (p<0,001). Pós testes de Bonferroni demonstraram que camundongos 3xTg-AD de 4 e 12 meses exibiram maior latência primária no D1 (p<0,001 para ambos). Dados representados como média ± erro padrão.



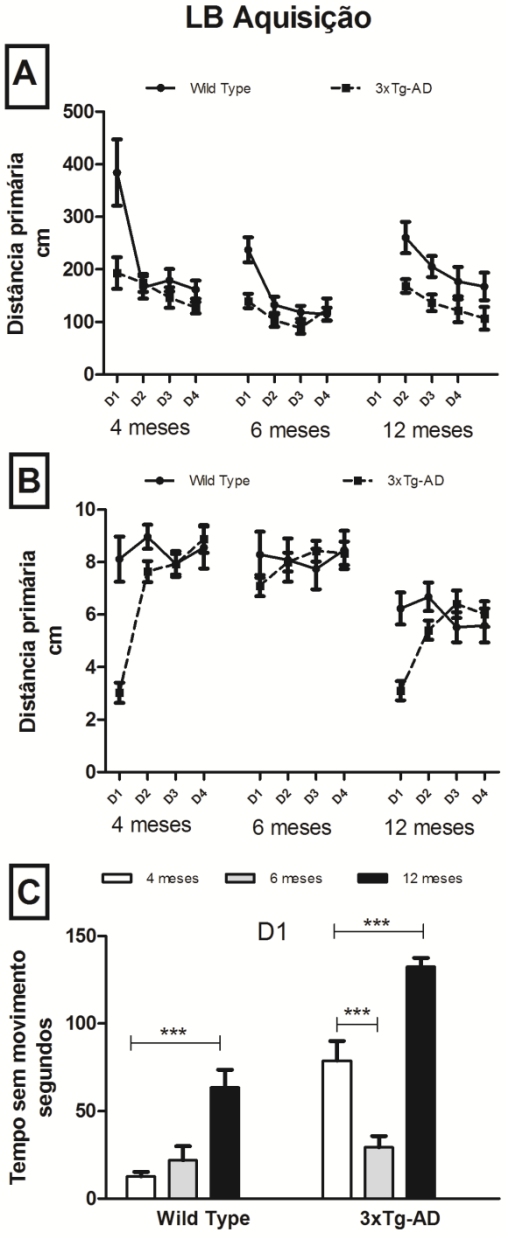
Com relação à distância primária, ANOVA de 3 vias revelou uma interação entre genótipo e dia, demonstrando que diferenças no genótipo dependem do dia avaliado: camundongos 3xTg-AD exibiram menor distância primária no D1 e D3. Também se observou um efeito do dia neste parâmetro: a distância primária no D1 foi maior do que todos os outros dias, independente do genótipo. Por fim, observou-se um efeito da idade, que foi devido à diferenças aos 6 meses comparado aos 4 e 12 meses de idade. Resumidamente, a distância primária diminuiu ao longo dos treinos; houve uma diferença relacionada à idade, em que camundongos de 6 meses de idade diferiram dos de 4 e 12 meses de idade; e no D1 e D3 os camundongos 3xTg-AD exibiram menor distância primária comparado aos camundongos WT (Figura – 8A).

Com relação à velocidade primária, observou-se que o efeito do genótipo depende da idade e do dia avaliados. Respectivamente: diferenças no genótipo foram detectadas aos 12 meses de idade, comparado a 4 e 6 meses; e a velocidade primária dos camundongos 3xTg-AD foi menor do que nos WT no D1 e D2. Esses resultados demonstram que houve uma redução na velocidade primária, que se inicia aos 12 meses de idade. Além disso, camundongos 3xTg-AD exibiram menor velocidade primária nos D1 e D2 (Figura – 8B).

Devido ao comportamento de *freezing* observado pelo experimentador no D1, e à pronunciada diferença na velocidade primária no mesmo dia, principalmente nos camundongos 3xTg-AD de 4 e 12 meses de idade, avaliamos o comportamento de *freezing*. Analisamos o tempo (em segundos) sem movimento no D1 (média de tempo sem movimento de T1 a T4 do D1). Os resultados demonstraram que camundongos 3xTg-AD exibiram maior *freezing*, principalmente aos 4 e 12 meses de idade. Observou-se também um efeito da idade, em que camundongos de 12 meses apresentaram maior comportamento de *freezing*, independente do genótipo. Camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade não demonstraram *freezing* no D1 do LB (Figura – 8C).

Figura 8 – Labirinto de Barnes: Distância percorrida e velocidade para encontrar o furo alvo durante os testes de treinamento e comportamento de *freezing* no D1. **(A)** ANOVA de 3 vias demonstrou um efeito do genótipo ($F_{1,240}$=40,19, $p$<0,001), da idade ($F_{2,240}$=15,32, $p$<0,001) e do dia ($F_{3,240}$=23,90, $p$<0,001). Também houve uma interação entre genótipo e dia ($F_{3,240}$=7,49, $p$<0,001). Pós testes de Bonferroni

demonstraram que 3xTg-AD exibiram menor distância primária no D1 ($p$<0,01) e D3 ($p$<0,05). Além disso, encontramos que, independente do genótipo, a *distância primária* no D1 foi maior do que todos os outros dias ($p$<0,01 para todos). O efeito da idade foi devido à diferenças aos 6 meses comparado aos 4 e 12 meses ($p$<0,01 para ambos). **(B)** ANOVA de 3 vias demonstrou efeito do genótipo ($F_{1,240}$=13,80, $p$<0,001), da idade ($F_{2,240}$=45,91, $p$<0,001) e do dia ($F_{3,240}$=11.75, $p$<0,001) na velocidade primária. Além disso, houve interação entre genótipo x idade ($F_{2,240}$=3,09, $p$<0,05) e genótipo x dia ($F_{1,340}$=13,93, $p$<0,001). Camundongos de 12 meses diferiram de camundongos de 4 e 6 meses (p<0,001 para ambos), independente do genótipo. E a velocidade primária dos camundongos 3xTg-AD foi menor do que nos Wild Type no D1 (p<0,001) e D2 (p<0,05). **(C)** ANOVA de 2 vias de medidas repetidas demonstrou interação entre genótipo x idade no comportamento de *freezing* ($F_{2,60}$=9,06, $p$<0,0001): camundongos 3xTg-AD exibiram maior comportamento de freezing aos 4 e 12 meses de idade (p<0,001). Camundongos 3xTg-AD exibiram maior tempo sem movimento ($F_{1,60}$=50,86, $p$<0,0001). Por fim, houve um efeito da idade ($F_{2,60}$=41,72, $p$<0,0001): independente do genótipo, camundongos de 12 meses de idade apresentaram maior tempo sem movimento (p<0,001). Dados representados como média ± erro padrão. *** p<0,001.

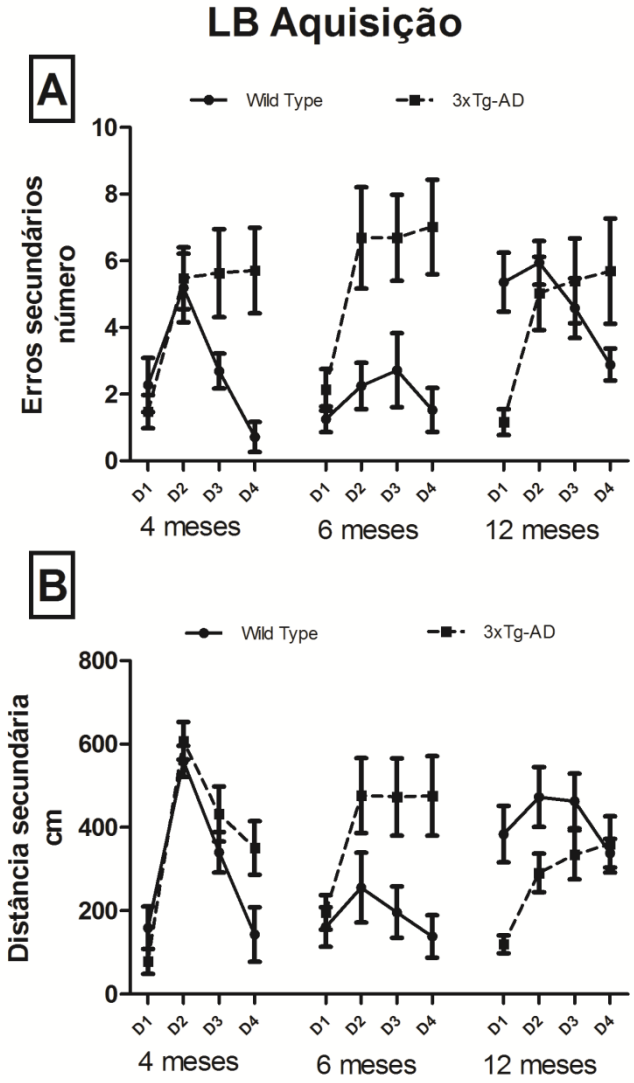


Como muitos camundongos não entravam na caixa de escape logo após encontrar o furo alvo e continuavam explorando o labirinto (comportamento observado por outros pesquisadores) (HARRISON et al., 2006; REISERER et al., 2007), procedemos a análise do comportamento exibido pelos camundongos após encontrar o furo alvo. Dessa forma, avaliamos os erros secundários e distância secundária, como descrito no item 4.3.6.1.

Os erros secundários dependiam da idade e do dia avaliados: diferenças no genótipo estavam presentes aos 4 e 6 meses de idade, e foram detectadas no D3 e D4 (Figura – 9A). A distância secundária também dependia da idade e do dia avaliados: diferenças no genótipo estavam presentes aos 6 e 12 meses de idade, e foram devidas à diferenças no D4 (Figura – 9B).

Resultados dos erros secundários e distância secundária mostraram que as diferenças eram mais pronunciadas aos 6 meses de idade, especialmente no D4: camundongos 3xTg-AD continuavam explorando furos não alvo e andando no labirinto após encontrar o furo alvo.

Figura 9 – Labirinto de Barnes: Exploração e locomoção após encontrar o furo alvo durante os testes de treinamento. **(A)** ANOVA de 3 vias demonstrou interação entre genótipo x idade ($F_{2,240}$=6,99, $p$<0,001) e genótipo x dia ($F_{3,240}$=7,49, $p$<0,001) nos erros primários. Diferenças no genótipo foram encontradas aos 4 (p<0,05) e 6 meses de idade (p<0,01), no D3 (p<0,01) e D4 (p<0,001). **(B)** ANOVA de 3 vias demonstrou interação entre genótipo x idade ($F_{2,240}$=15,24, $p$<0,001) e genótipo x dia ($F_{3,240}$=17,71, $p$<0,001). Diferenças no genótipo estavam presentes aos 6 (p<0,001) e 12 meses de idade (p<0,01); e foram devidas à diferenças no D4 ($p$<0,001). Dados representados como média ± erro padrão.



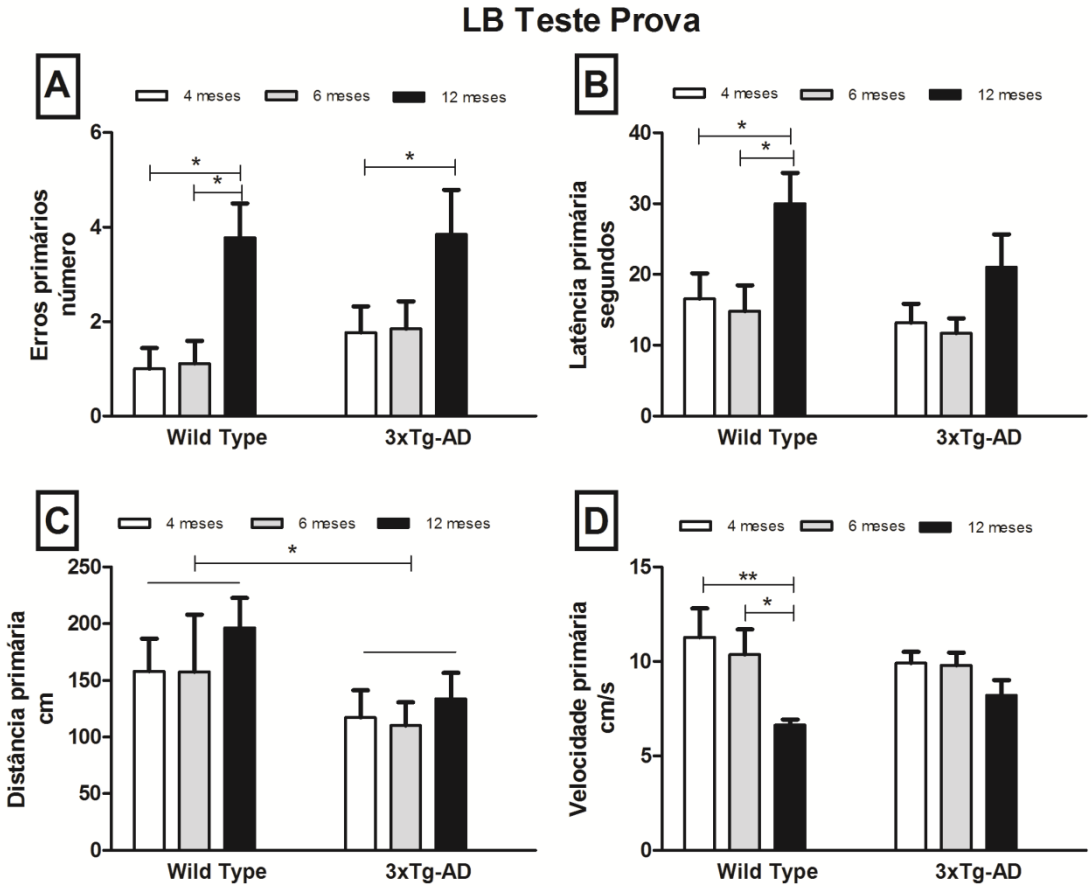

Como abordado anteriormente, após os dias de treino, os animais eram submetidos ao Teste Prova. Os resultados do TP são apresentados a seguir.

Assim como durante os dias de treino, no TP avaliamos o número de erros primários cometidos pelos animais até encontrarem o furo alvo (agora sem a caixa

de escape), a latência primária, distância primária e velocidade primária. A Figura – 10ª mostra que houve um aumento dependente da idade no número de erros primários no TP. Um efeito da idade também foi observado na latência primária, e foi detectado no grupo Wild Type (Figura – 10B). Com relação à distância primária, camundongos 3xTg-AD apresentaram menor distância para encontrar o furo alvo (Figura – 10C). Também houve um efeito da idade na velocidade primária, que foi devido à uma redução com a idade neste parâmetro no grupo Wild Type (Figura – 10D).

Esses resultados demonstraram que, no TP, o número de erros primários aumentou com a idade, independente do genótipo (Figura – 10A), que a latência primária aumentou com a idade (mas atingiu significância estatística apenas no grupo WT, Figura – 10B), e que houve uma redução da velocidade primária aos 12 meses de idade apenas no grupo Wild Type (Figura – 10D). Além disso, camundongos 3xTg-AD, em geral, exibiram menor distância primária no TP (Figura – 10C).

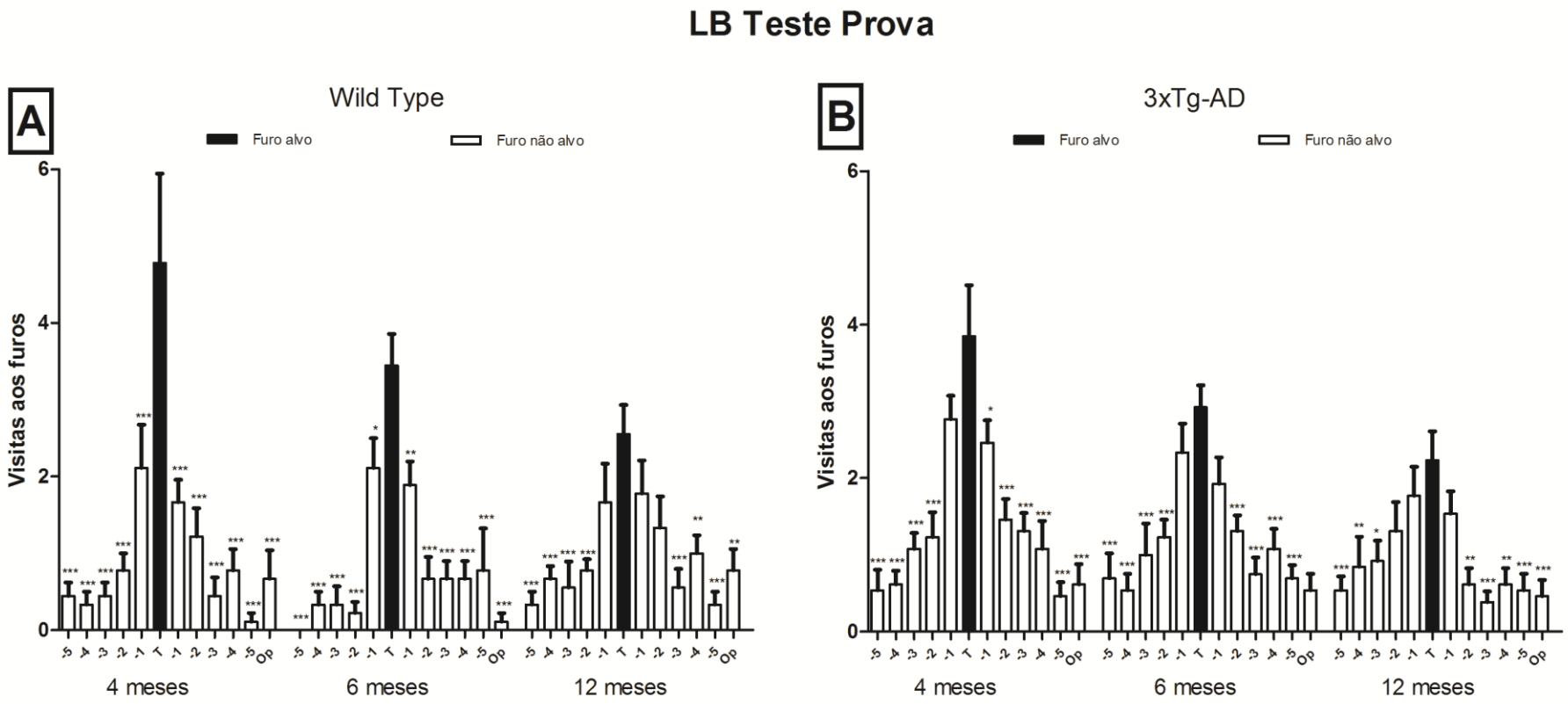
Figura 10 – Labirinto de Barnes: Teste Prova. **(A)** ANOVA de 2 vias de medidas repetidas demonstrou um efeito da idade no número de erros primários ($F_{2,60}$=7,83, p<0,001). **(B)** ANOVA de 2 vias de medidas repetidas também demonstrou um efeito da idade na latência primária ($F_{2,60}$=6,70, p<0,01), que foi detectado no grupo WT. **(C)** Na distância primária, observou-se um efeito do genótipo ($F_{1,59}$=4,47, p<0,05), no qual camundongos 3xTg-AD exibiram menor distância para encontrar o furo alvo (p<0,05). (D) Observou-se um efeito da idade na velocidade primária ($F_{2,59}$=7,23, p<0,01), detectado no grupo Wild Type. Dados representados como média ± erro padrão. * *p*<0,05, ** *p*<0,01. Resultados avaliados através de ANOVA de 2 vias de medidas repetidas.




Apesar dos camundongos 3xTgAD demonstrarem melhor performance para encontrar o furo alvo no TP (Figura – 10C), observou-se diferenças significantes no número de visitas para cada furo no TP, em todas as idades (Figura – 11). Aos 4 meses de idade, camundongos Wild Type exibiram uma busca seletiva para o furo alvo, como demonstrado por mais visitas ao furo alvo do que qualquer outro furo (Figura – 11). Nesta idade, camundongos 3xTg-AD demonstraram busca seletiva para o furo alvo, mas também para um furo não alvo adjacente (Figura – 11B). Aos 6 meses de idade, camundongos Wild Type continuaram a procurar o furo alvo (Figura

– 11A). Nesta idade, camundongos 3xTg-AD visitaram dois furos não alvo, além do furo alvo (Figura – 11B). Aos 12 meses de idade, ambos os camundongos Wild Type e 3xTg-AD visitaram três furos não alvo, além do furo alvo (Figura – 11A e 11B). Esses resultados demonstram que houve um déficit sutil na busca pelo furo alvo nos camundongos 3xTg-AD, e que esse déficit pode ser observado já aos 4 meses de idade, e também aos 6 meses de idade. Aos 12 meses de idade, esse déficit também estava presente no camundongo Wild Type.

Figura 11 – Labirinto de Barnes: Número de visitas para cada furo durante o teste prova. (A) ANOVA de 1 via demonstrou que camundongos Wild Type exibiram procura seletiva para o furo alvo aos 4 e 6 meses de idade (como demonstrado por mais visitas ao furo alvo do que qualquer outro furo). Aos 12 meses de idade, houve um déficit na busca para o alvo (três furos adjacentes ao alvo e furo alvo foram preferidos pelos camundongos). (B) ANOVA de 2 vias demonstrou que Déficit na busca pelo alvo foi visto em todas as idades nos camundongos 3xTg-AD. T = furo alvo. Barras brancas representam furos não alvo. Proximidade dos furos não alvo ao furo alvo foi a mesma como ilustrada na figura. Op = furo não alvo, oposto ao furo alvo. Dados representados como média ± erro padrão. * $p$<0,05, ** $p$<0,01, *** $p$<0,001. ANOVA de 1 via, seguida de teste de comparações múltiplas de Dunnett foi utilizada para cada idade, em cada genótipo.

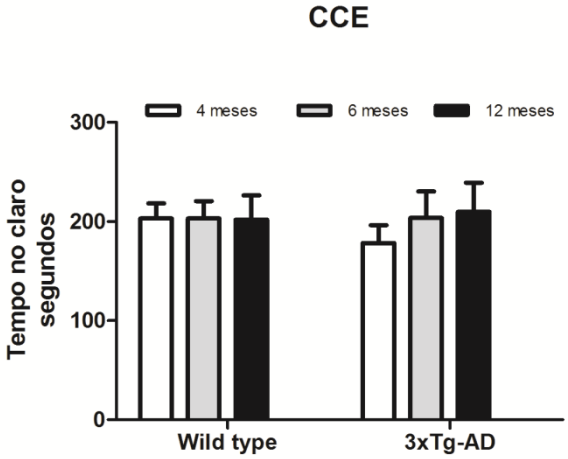


### 5.1.2 Caixa Claro Escuro

Como déficits de memória podem ser influenciados por diferenças na ansiedade, avaliou-se a ansiedade nos camundongos 3xTg-AD. Os camundongos foram submetidos à CCE, já que exposições prévias a esse aparato não parecem alterar o comportamento dos camundongos em testes posteriores (BAILEY; CRAWLEY, 2009).

Camundongos com comportamento semelhante à ansiedade gastam mais tempo no compartimento escuro (BAILEY; CRAWLEY, 2009). ANOVA de duas vias demonstrou que camundongos WT e 3xTg-AD gastaram a mesma quantidade de tempo no compartimento claro (Figura – 12).

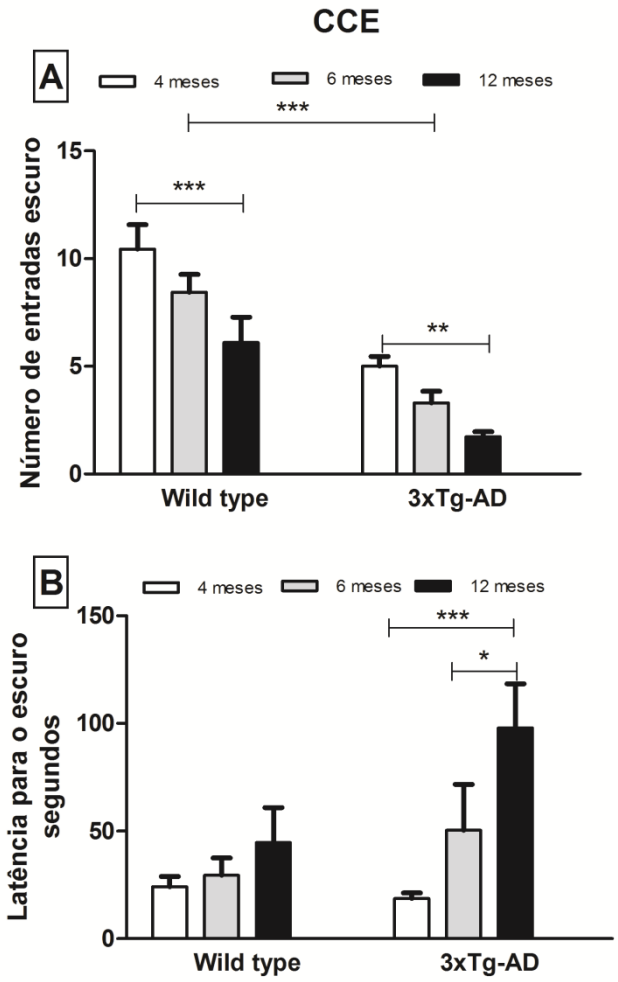
Figura 12 – Caixa Claro Escuro: Tempo gasto no compartimento claro (segundos). ANOVA de 2 vias demonstrou que não houve diferenças nem com relação ao genótipo, nem à idade dos camundongos.Dados representados como média ± erro padrão




Com relação ao número de entradas no compartimento escuro, observou-se que este parâmetro reduziu com a idade e foi menor nos camundongos 3xTg-AD (Figura – 13A).

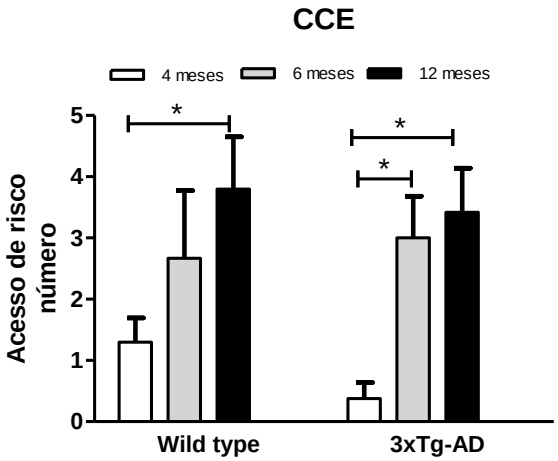
Ainda, a latência para entrar no compartimento escuro aumentou com a idade, especialmente nos camundongos 3xTg-AD (Figura – 13B).

Figura 13 – Caixa Claro-Escuro. **(A)** ANOVA de 2 vias demonstrou um efeito da idade ($F_{2,58}$=13,35, p<0,001) e do genótipo ($F_{1,58}$=69,72, p<0,001) no número de entradas no compartimento escuro. O número de entradas no compartimento escuro reduziu com a idade e foi menor nos camundongos 3xTg-AD. **(B)** ANOVA de 2 vias demonstrou um efeito da idade para entrar no compartimento escuro ($F_{2,59}$=5,11, p<0,01), que foi devido à maior latência dos camundongos 3xTg-AD de 12 meses de idade. Dados representados como média ± erro padrão. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.




O número de risco de acesso realizado do compartimento claro para o escuro (Figura – 14) aumentou com a idade em ambos os genótipos. Nos camundongos 3xTg-AD, o número de acesso de risco aumentou à partir dos 6 meses de idade (comparado aos 12 meses do grupo controle).

Figura 14 – Caixa Claro-Escuro: número de acesso de risco, realizado do compartimento claro, para o escuro. ANOVA de 2 vias demonstrou um efeito da idade ($F_{2,56}$=7,01, p<0,01), em que o número de acesso de risco aumenta com a idade. Dados representados como média ± erro padrão.* p<0,05.



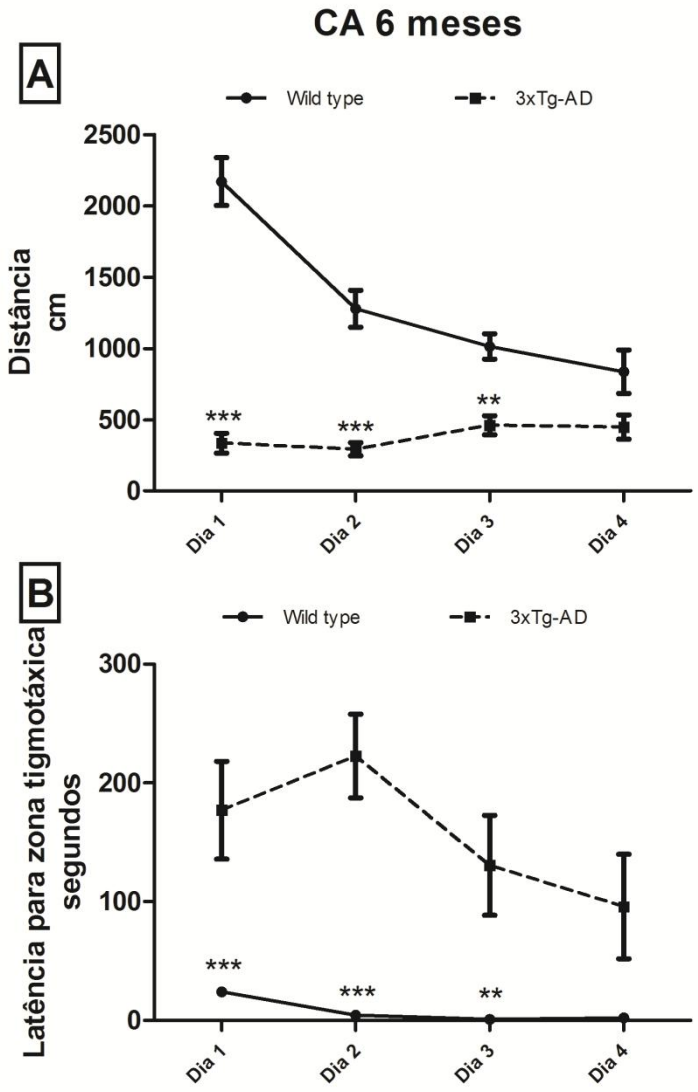

5.1.3 Campo Aberto

No LB, camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade exibiram diferença marcante nos erros secundários e na distância secundária comparado com camundongos Wild Type de mesma idade: camundongos transgênicos continuavam visitando furos não alvo e se locomovendo no labirinto após encontrar o furo alvo. Além disso, a velocidade primária aos 6 meses de idade foi diferente da dos camundongos de 4 e 12 meses de idade. Portanto, testou-se camundongos adicionais de 6 meses de idade no CA, para procurar alterações de locomoção/exploração. Dessa forma, camundongos foram submetidos ao CA durante 5 minutos, por 4 dias consecutivos.

A figura – 15 mostra que camundongos 3xTg-AD locomoveram-se menos do que camundongos Wild Type nos três primeiros dias de exposição ao CA (Figura – 15A). Como a redução da locomoção dos camundongos 3xTg-AD foi provavelmente devido ao comportamento de *freezing*, calculou-se a latência para atingir a zona tigmotáxica. Corroborando com dados da distância movida, camundongos 3xTg-AD

demoraram mais para deixar o centro do CA e atingir a zona tigmotáxica no D1 e D3 (Figura – 15B).

Figura 15 – Campo aberto: Habituação durante 4 dias. **(A)** ANOVA de 2 vias de medidas repetidas demonstrou interação entre genótipo x dia ($F_{3,48}$=43,80, p<0,001) na distância movida no CA. Pós testes de Bonferroni demonstraram que camundongos 3xTg-AD locomoveram-se menos do que camundongos WT no D1 (*p<0,*001), D2 (p<0,001) e D3 (p<0,01). **(B)** ANOVA de 2 vias de medidas repetidas demonstrou interação entre genótipo x dia ($F_{3,48}$=6,63, p<0,001). Pós testes de Bonferroni demonstraram que camundongos 3xTg-AD apresentaram maior latência para deixar o centro do CA e atingir a zona tigmotáxica no D1 (p<0,001), D2 (p<0,001) e D3 (p<0,01). Dados representados como média ± erro padrão. ** p<0,01, *** p< 0,001.



## 5.2 Experimento 2: Avaliação temporal, descritiva, de peptídeo β-amilóide no SNC

Neste experimento analisamos a presença de peptídeo β-amilóide e/ou da proteína APP humana na amígdala, no córtex, no hipocampo e subículo de camundongos Wild Type e 3xTg-AD.

As análises de imunohistoquímica demonstraram marcações positivas para o anticorpo 6E10 apenas no cérebro dos camundongos 3xTg-AD, e não em camundongos Wild Type.

Marcações positivas para 6E10 foram encontradas nos camundongos 3xTg-AD já aos 4 meses de idade. Nesta idade, verificou-se grande quantidade de marcação intraneuronal na região CA1 do hipocampo, no subículo, na amígdala e em menor número no córtex. Aos 6 meses, a quantidade de neurônios positivos para o anticorpo 6E10 pareceu aumentar (em comparação aos camundongos 3xTg-AD de 4 meses) nessas mesmas regiões, mantendo-se no meio intracelular. Aos 8 meses de idade, observou-se maior quantidade de neurônios marcados (relativo a animais de 6 meses de idade) principalmente no subículo e no córtex. Além disso, observaram-se marcações no meio extracelular no subículo e no córtex. Aos 12 meses de idade, a quantidade de neurônios positivos para o anticorpo parecia aumentar no córtex (com relação aos animais de 8 meses) onde também foram encontradas áreas de marcação extracelular. Entretanto, no hipocampo (principalmente na região CA1 do hipocampo analisada) e na amígdala a quantidade de neurônios marcados parecia diminuir. Também se observou marcações extracelulares de peptídeo β-amilóide no hipocampo e córtex.

As marcações com o anticorpo 6E10 encontradas no hipocampo e no córtex aos 8 e 12 meses de idade assemelham-se às placas amilóides presentes em pacientes com Alzheimer.

As fotomicrografias a seguir mostram a marcação do peptídeo β-amilóide e/ou da proteína APP humana com o anticorpo 6E10 na amígdala, no hipocampo e no córtex de camundongos Wild Type e 3xTg-AD.

Figura 16– Fotomicrografia do hipocampo. À esquerda, cortes de camundongos Wild Type de 4, 6, 8 e 12 meses; e à direita, cortes de camundongos 3xTg-AD nas mesmas idades, em diferentes aumentos.

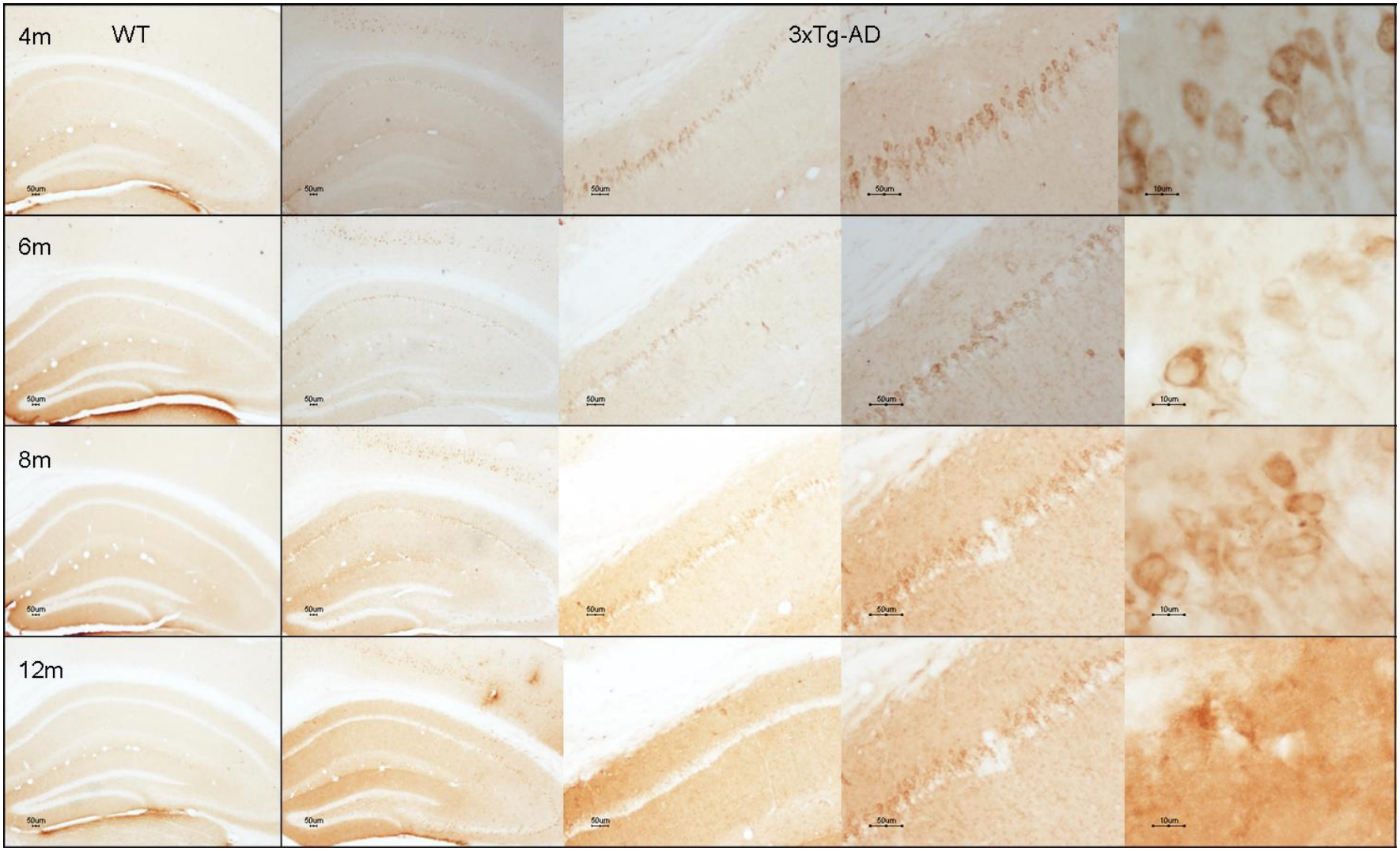


Figura 17 – Fotomicrografia do subículo. À esquerda, cortes de camundongos Wild Type de 4, 6, 8 e 12 meses; e à direita, cortes de camundongos 3xTg-AD nas mesmas idades, em diferentes aumentos.

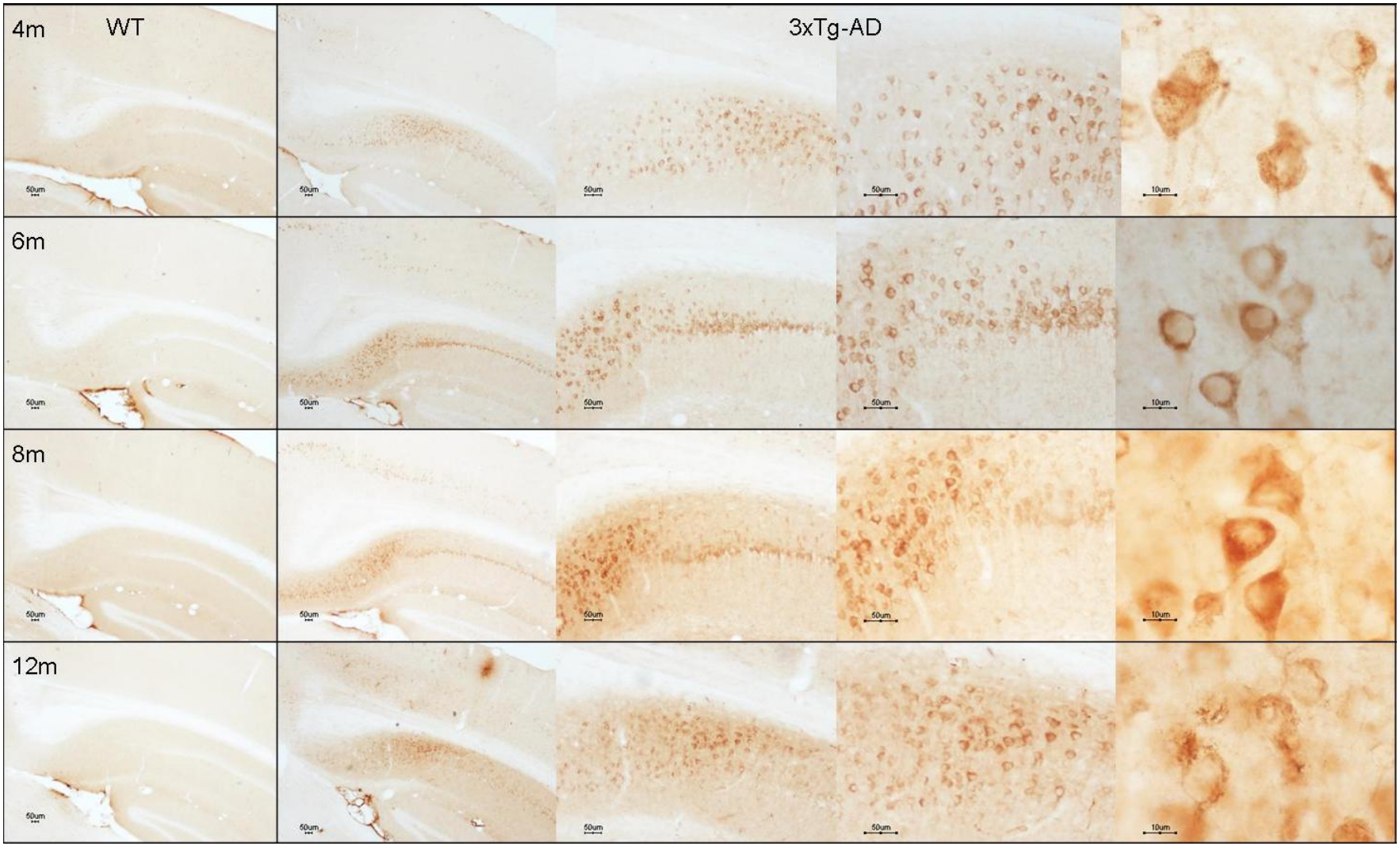


Figura 18 – Fotomicrografia do córtex. À esquerda, cortes de camundongos Wild Type de 4, 6, 8 e 12 meses; e à direita, cortes de camundongos 3xTg-AD nas mesmas idades, em diferentes aumentos. Seta: depósito extracelular.

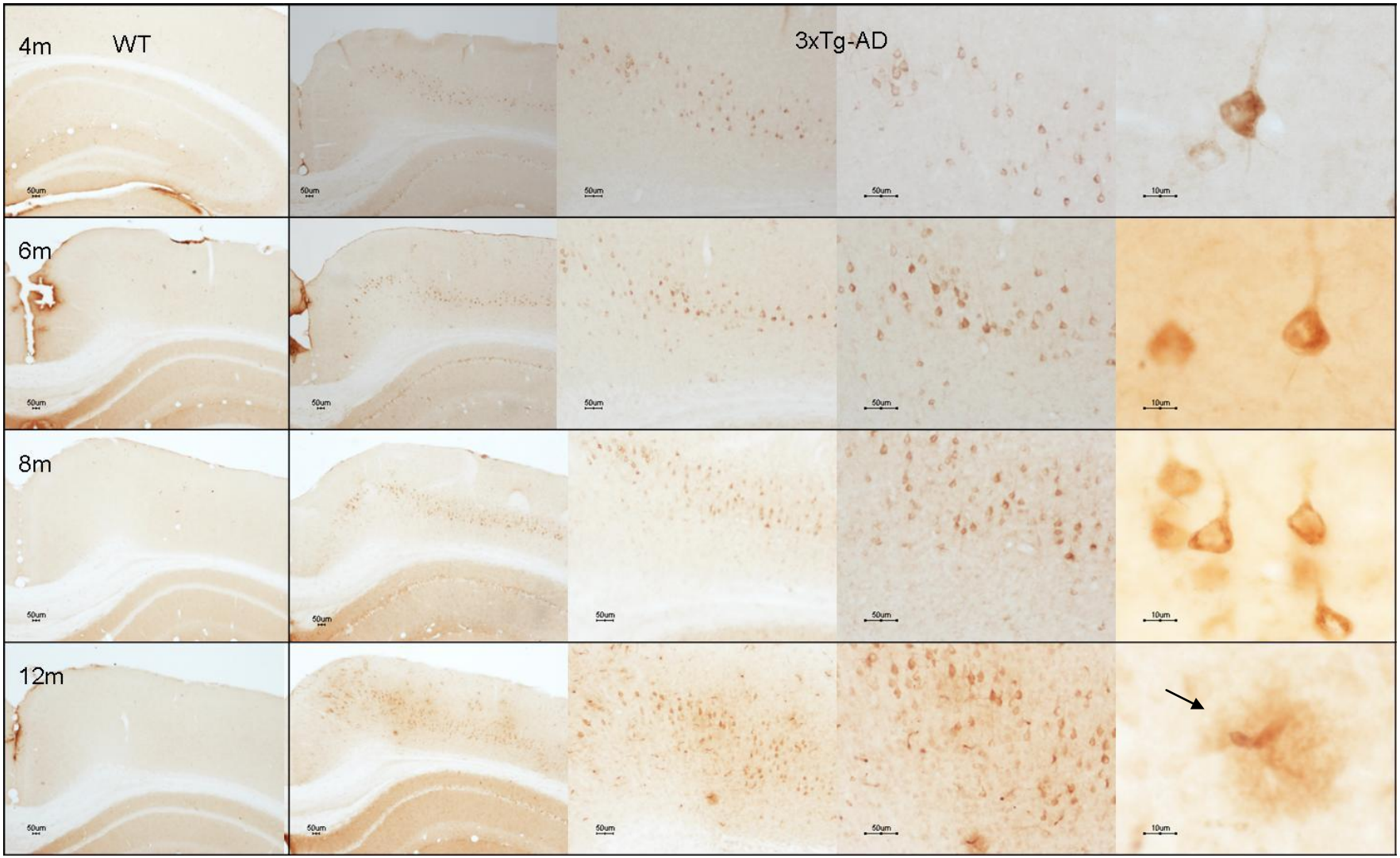


Figura 19 – Fotomicrografia da amígdala. À esquerda, cortes de camundongos Wild Type de 4, 6, 8 e 12 meses; e à direita, cortes de camundongos 3xTg-AD nas mesmas idades, em diferentes aumentos.

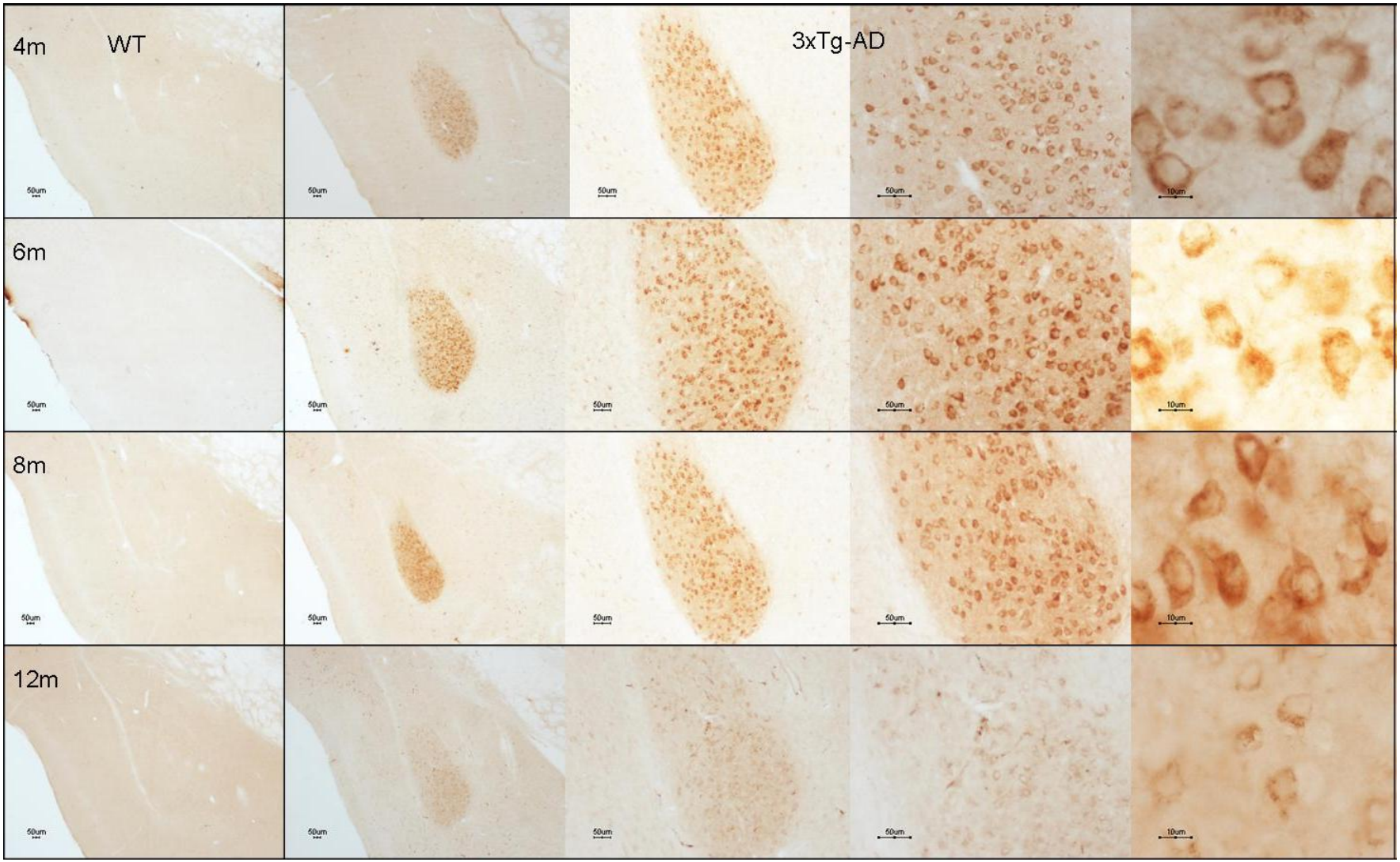
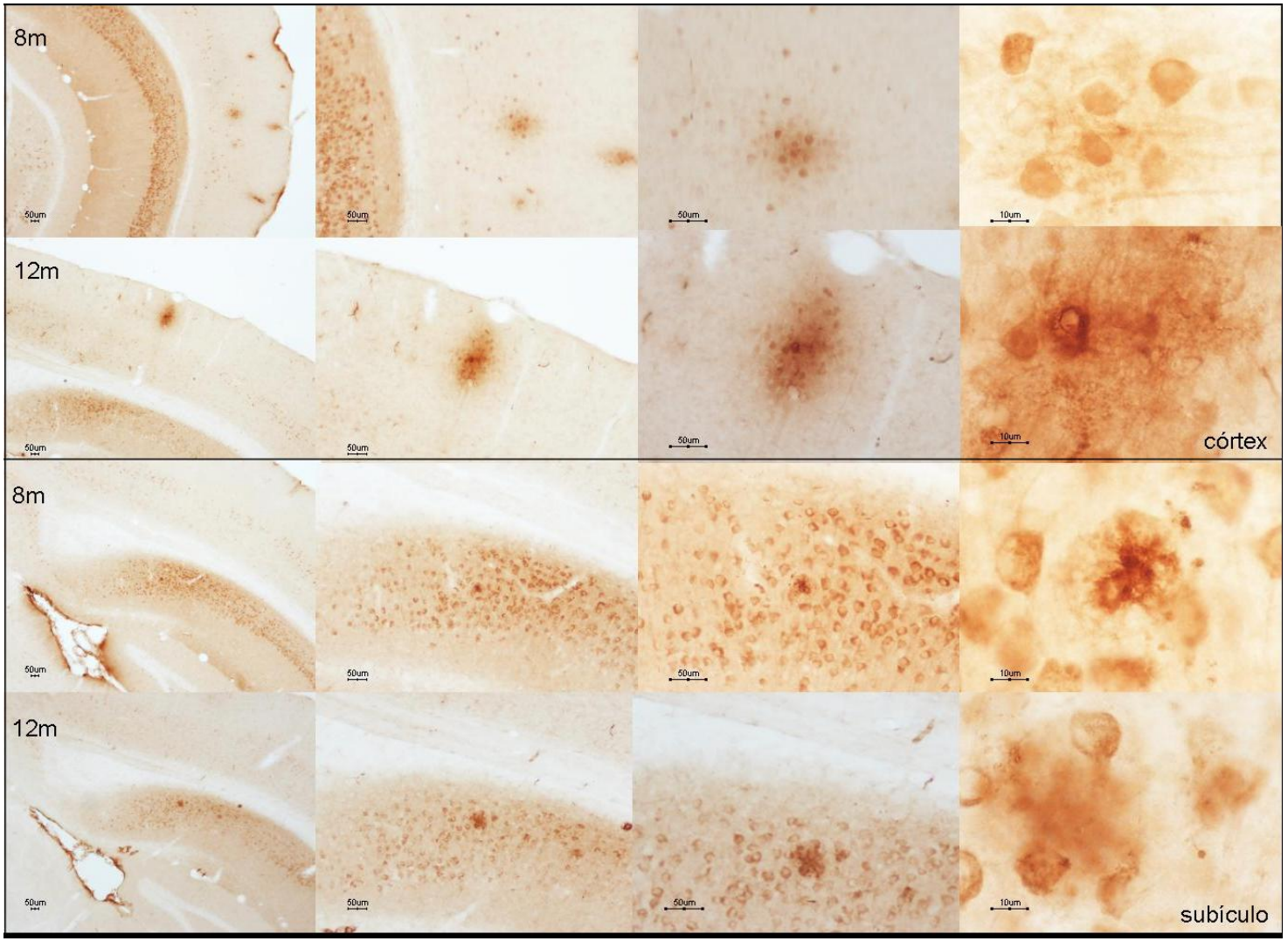


Figura 20 – Fotomicrografia de depósito extra-celular. Na parte superior, cortes de córtex de camundongos 3xTg-AD de 8 e 12 meses; Na parte inferior, cortes do subículo camundongos 3xTg-AD de 8 e 12 meses.



## 5.3 Experimento 3: Avaliação temporal de citocinas no sangue

Neste experimento, analisamos os níveis basais de citocinas séricas em camundongos Wild Type e 3xTg-AD aos 4, 5, 6, 7 e 8 meses de idade. Os níveis das citocinas são apresentados na tabela – 1 e tabela – 2:

Tabela 1 – Níveis de citocinas séricas (pg/mL) dos animais Wild Type nas diferentes idades

| Idade | IL-6 | MCP-1 | IL-10 | TNF-α | IL-1β |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 meses | 0,00±0,00 | 0,73±1,37 | 0,00±0,00 | 0,06±0,26 | 0,00±0,00 |
| 5 meses | 0,47±1,21 | 4,58±7,65 | 0,08±0,35 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 6 meses | 0,00±0,00 | 0,63±1,16 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 7 meses | 0,00±0,00 | 1,46±5,46 | 0,20±0,76 | 0,57±215 | 0,43±1,62 |
| 8 meses | 0,00±0,00 | 0,49±1,02 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão

Tabela 2 – Níveis de citocinas séricas (pg/mL) dos animais 3xTg-AD nas diferentes idades

| Idade | IL-6 | MCP-1 | IL-10 | TNF-α | IL-1β |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 meses | 0,32±0,79 | 0,00±0,00 | 1,44±4,16 | 0,06±0,28 | 0,00±0,00 |
| 5 meses | 0,17±0,70 | 0,19±0,77 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 6 meses | 0,39±1,27 | 0,53±1,22 | 0,74±3,13 | 0,19±0,55 | 0,00±0,00 |
| 7 meses | 0,00±0,00 | 0,51±1,11 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 8 meses | 0,09±0,33 | 1,11±1,73 | 0,37±1,44 | 0,12±0,46 | 0,00±0,00 |

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão

Como os níveis basais das citocinas mensuradas foram muito baixos, não encontramos diferenças nos níveis basais das citocinas avaliadas, nem com relação ao genótipo, nem à idade.

## 5.4 Experimento 4: Avaliação temporal e pareada de citocinas e de corticosterona no sangue e expressão de IL-1β e IL-6 no SNC, e de outros parâmetros periféricos

No experimento 3, o reduzido volume sanguíneo coletado por punção da veia submandibular (aproximadamente 150µL) não permitiu a análise de corticosterona dos camundongos. Além disso, como o experimento procedeu-se de uma forma longitudinal, ou seja, utilizando-se os mesmos animais ao longo das diferentes idades, tampouco foi possível coletar estruturas cerebrais.

Desta forma, neste experimento avaliamos os níveis séricos basais de IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α e IL-10, além de corticosterona de camundongos de 4, 6, 8 e 12 meses de idade.

Os níveis de citocinas séricas são apresentados nas tabelas – 3 e 4.

Tabela 3 – Níveis de citocinas séricas (pg/mL) dos animais Wild-Type nas diferentes idades

| Idade | IL-6 | MCP-1 | IL-10 | TNF-α | IL-1β |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 meses | 0,00±0,00 | 3,30±1,62 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 6 meses | 0,00±0,00 | 2,86±1,37 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 8 meses | 0,00±0,00 | 3,02±1,34 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 12 meses | 0,00±0,00 | 3,63±1,55 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão

Tabela 4 – Níveis de citocinas séricas (pg/mL) dos animais 3xTg-AD nas diferentes idades

| Idade | IL-6 | MCP-1 | IL-10 | TNF-α | IL-1β |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 meses | 0,00±0,00 | 3,55±1,44 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 6 meses | 0,00±0,00 | 2,92±2,37 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 8 meses | 0,00±0,00 | 3,90±1,55 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 12 meses | 0,00±0,00 | 3,44±1,62 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |

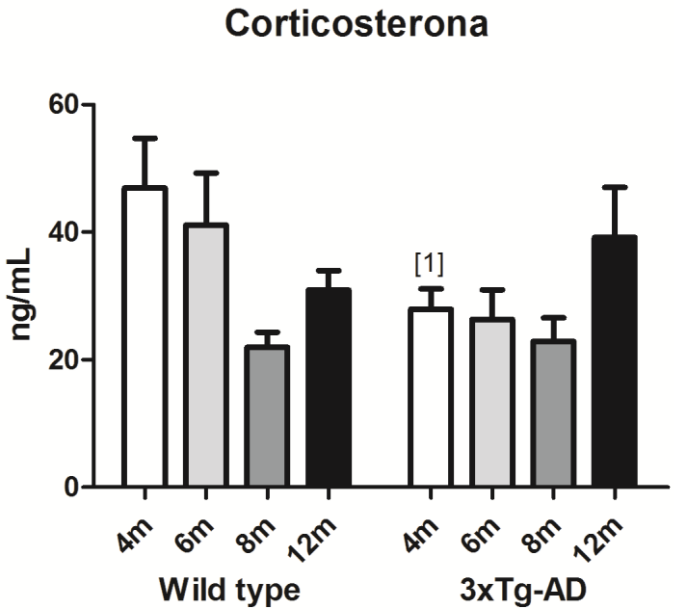
Os dados são apresentados como média ± desvio padrão

Assim como no experimento 3, os níveis de citocinas séricas basais apresentaram-se muito baixos, não sendo possível detectar diferenças nem com relação ao genótipo, nem à idade.

Procedeu-se, então, a análise de corticosterona sérica nas mesmas amostras de sangue coletadas para avaliação das citocinas.

Verificou-se que os níveis séricos de corticosterona variam com a idade de forma diferente para camundongos Wild Type e 3xTg-AD. Nos camundongos Wild Type, os níveis são maiores em camundongos mais jovens (principalmente aos 4 meses de idade), reduzindo com a idade. Já, nos camundongos 3xTg-AD, os níveis de corticosterona são mais baixos em camundongos mais jovens, e aumentam com a idade (Figura – 21).

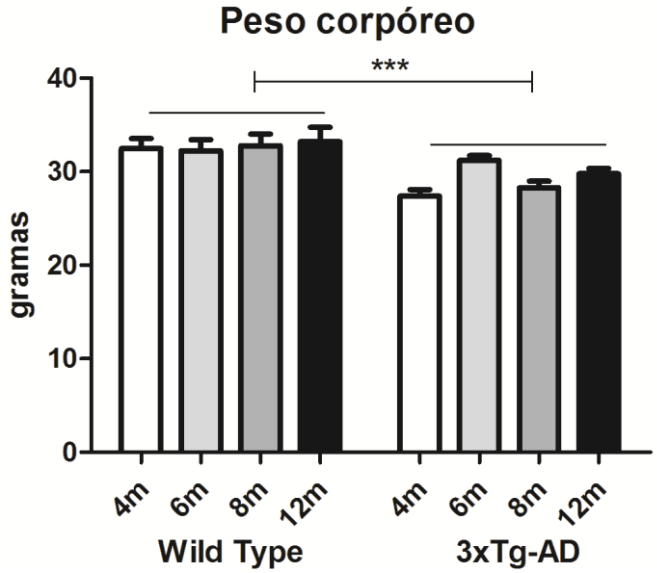
Figura 21 – Níveis basais de corticosterona sérica (ng/mL) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades. ANOVA de 2 vias demonstrou que houve interação entre o genótipo e a idade ($F_{3,78}$=3,08, p<0,05). Pós teste de Bonferroni demonstrou que camundongos 3xTg-AD de 4 meses de idade apresentaram menor nível de corticosterona sérica, com relação aos camundongos Wild Type de mesma idade (p<0.05). Dados representados como média ± erro padrão. [1] p<0,05 com relação ao grupo Wild Type de mesma idade.



Nesse experimento, avaliamos também os pesos corpóreos dos animais, e pesos relativos de adrenais, baço, fígado e timo.

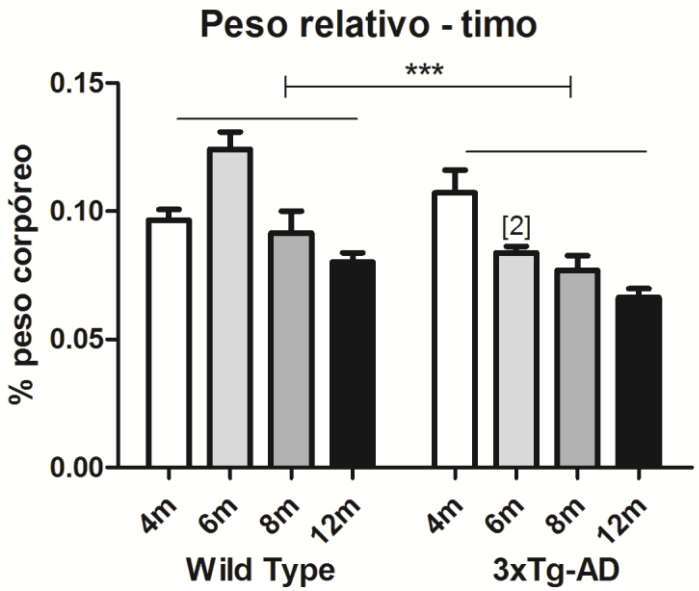
Em geral, o peso corpóreo dos camundongos 3xTg-AD apresentou-se menor do que camundongos Wild Type nas diversas idades (Figura – 22).

Figura 22 – Peso corpóreo (gramas) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades. ANOVA de 2 vias demonstrou que há um efeito do genótipo ($F_{1,75}$=27,06, p<0,001). Dados representados como média ± erro padrão. *** p<0,001.



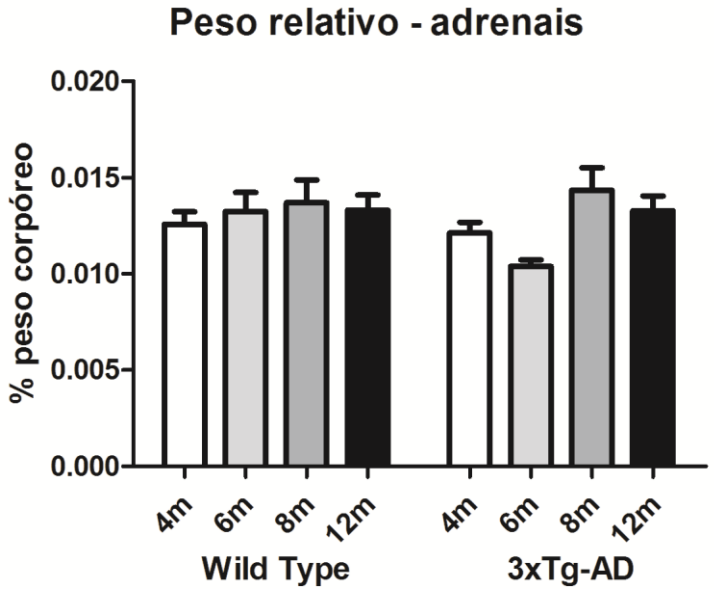

O peso relativo do timo diminuiu com a idade, em ambos os genótipos. Aos 6 meses de idade, camundongos 3xTg-AD apresentaram menor peso relativo, comparado aos animais Wild Type de mesma idade (Figura – 23).

Figura 23 – Peso relativo do timo (% de peso corpóreo) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades. ANOVA de 2 vias demonstrou que há interação entre genótipo e idade ($F_{3,73}$=6,42, p<0,001). Também houve um efeito da idade ($F_{3,73}$=11,76, p<0,001), na medida em que o peso do timo diminui com a idade. Pós teste de Bonferroni demonstrou que camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade apresentam menor peso relativo de timo, comparado com camundongos Wild Type de mesma idade (p<0,001). Dados representados como média ± erro padrão. *** p< 0,001. [2] p<0,001 com relação ao grupo Wild Type de mesma idade.



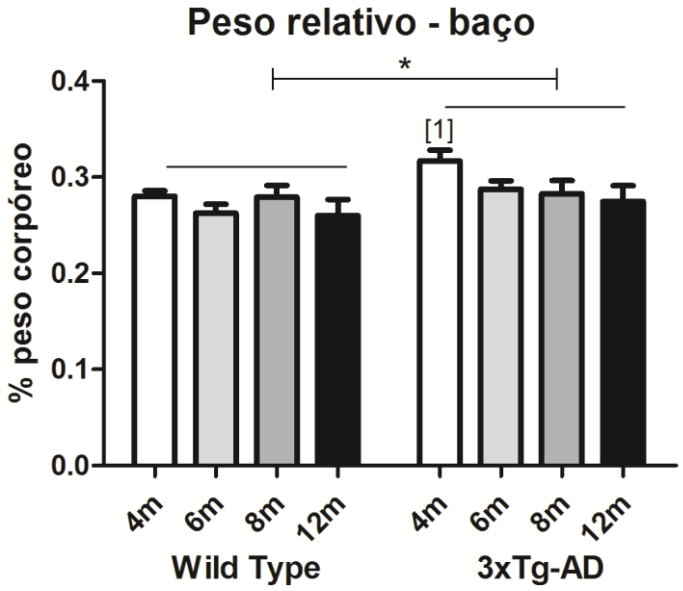

Não foram observadas diferenças significativas com relação ao peso relativo das adrenais, nem em relação ao genótipo, nem à idade (Figura – 24).

Figura 24 – Peso relativo das adrenais (% de peso corpóreo) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades. ANOVA de 2 vias demonstrou que não há diferenças estatísticas entre Wild Type e 3xTg-AD. Dados representados como média ± erro padrão.



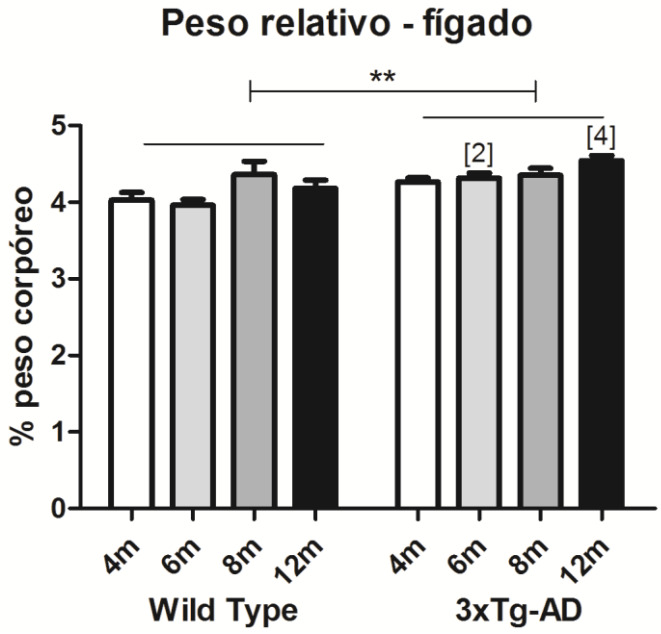

O peso relativo do baço diferiu entre camundongos Wild Type e 3xTg-AD. Essa diferença foi devido ao maior peso relativo do baço de camundongos 3xTg-AD de 4 meses de idade, comparado com seu controle de mesma idade (Figura – 25).

Figura 25 – Peso relativo do baço (% de peso corpóreo) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades. ANOVA de 2 vias demonstrou um efeito do genótipo ($F_{1,74}$=5,23, p<0,05). Pós teste de Bonferroni demonstrou que camundongos 3xTg-AD de 4 meses idade apresentaram maior peso relativo do baço, comparado aos camundongos Wild Type de mesma idade (p<0,05). Dados representados como média ± erro padrão. * p<0,05. [1] p< 0,05 com relação ao grupo Wild Type de mesma idade.




De forma semelhante, houve uma diferença entre os genótipos com relação ao peso relativo do fígado. Camundongos 3xTg-AD de 6 e 12 meses de idade apresentaram maior peso relativo de fígado, com relação a camundongos Wild Type de mesma idade (Figura – 26).

Figura 26 – Peso relativo do fígado (% de peso corpóreo) em camundongos Wild Type e 3xTg-AD em diferentes idades. ANOVA de 2 vias demonstrou um efeito do genótipo ($F_{1,75}$=10,57, p<0,01). Pós teste de Bonferroni demonstrou que camundongos 3xTg-AD de 6 e 12 meses idade apresentaram maior peso relativo do fígado, comparado aos camundongos Wild Type de mesma idade (p<0,05 para ambos). Dados representados como média ± erro padrão. **p<0,01. [2] e [4] p< 0,05 com relação ao grupo Wild Type de mesma idade.




Prossegui-se a avaliação da expressão de RNA mensageiro de IL-1β e IL-6 no hipocampo através de RT-PCR. Todos os dados foram normalizados para o grupo Wild Type de 4 meses de idade. Abaixo, seguem os resultados dos dados relativos à IL-1β (Tabela – 5) e IL-6 (Tabela – 6).

Tabela 5 – Expressão de RNAm relativa de IL-1β no hipocampo de camundongos Wild Type e 3xTg-AD nas diferentes idades

| Idade | Wild Type | 3xTg-AD |
|---|---|---|
| 4 meses | 1,00±1,80 | 0,14±0,14 |
| 6 meses | 1,87±3,43 | 0,17±0,14 |
| 8 meses | 0,54±0,75 | 0,27±0,17 |
| 12 meses | 0,12±0,09 | 0,21±0,16 |

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão

ANOVA de 2 vias demonstrou que não houve efeito da idade ($F_{3,32}$=0,66), do genótipo ($F_{1,32}$=2,36) e nem interação entre idade x genótipo ($F_{3,32}$=0,79) na expressão de RNA mensageiro de IL-1β.

Tabela 6 – Expressão de RNAm relativa de IL-6 no hipocampo de camundongos Wild Type e 3xTg-AD nas diferentes idades

| Idade | Wild Type | 3xTg-AD |
|---|---|---|
| 4 meses | 1,00±1,45 | 3,55±1,44 |
| 6 meses | 0,09±0,08 | 2,92±2,37 |
| 8 meses | 0,30±0,46 | 3,90±1,55 |
| 12 meses | 0,06±0,04 | 3,44±1,62 |

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão

ANOVA de 2 vias demonstrou que não houve efeito da idade ($F_{3,32}$=1,20), do genótipo ($F_{1,32}$=1,83) e nem interação entre idade x genótipo ($F_{3,32}$=1,88) na expressão de RNA mensageiro de IL-6.

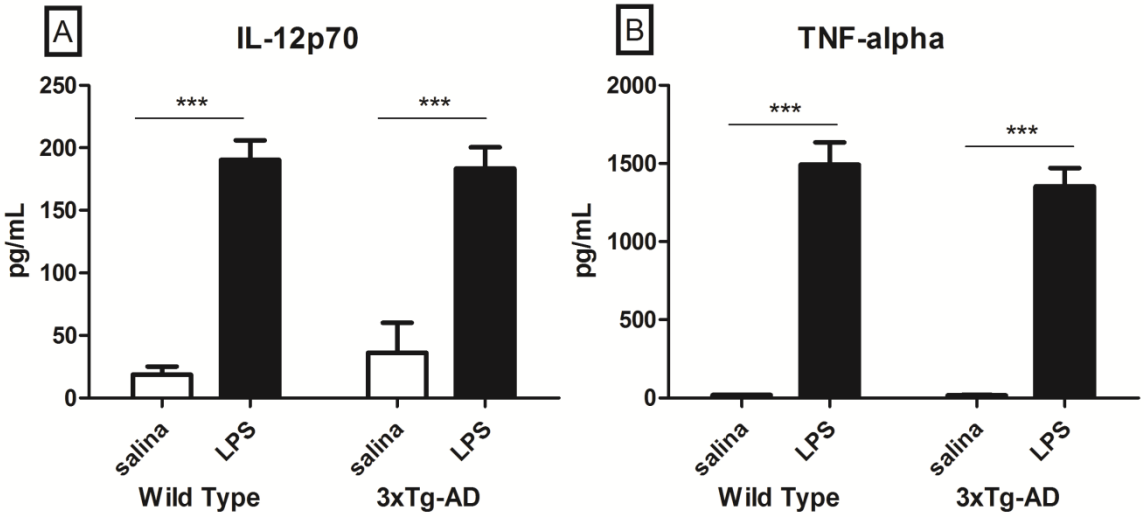
## 5.5 Experimento 5: Efeitos da administração de LPS na produção de citocinas periféricas e no SNC e nos níveis de corticosterona

Neste experimento analisamos a produção de citocinas periféricas e no SNC, e os níveis de corticosterona sérica após administração de salina ou LPS em camundongos Wild Type e 3xTg-AD de 12 meses de idade.

As citocinas analisadas nesse experimento incluíram: IL-12p70, TNF-α, INF-γ, IL-10 e IL-6 e a quimiocina MCP-1.

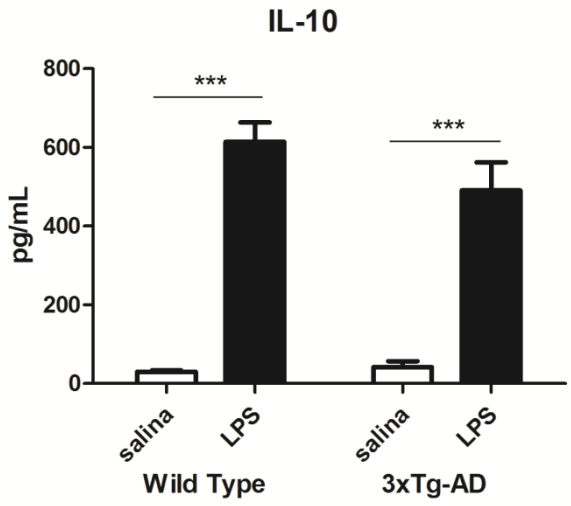
Não foram encontradas diferenças nos níveis de IL-12p70 com relação aos genótipos. Entretanto, houve um efeito do tratamento, sendo que, independente do genótipo, os níveis de IL-12p70 foram maiores nos animais tratados com LPS (Figura – 27A). Resultados semelhantes foram encontrados nos níveis de TNF-α (Figura – 27B).

Figura 27 – Níveis séricos (pg/mL) de IL-12p70 [A] e TNF-α [B] em camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de 12 meses de idade, após administração de salina ou LPS. ANOVA de 2 vias demonstrou que houve efeito do tratamento tanto para os níveis de IL-12p70 ([A]; F1,39=94,65, p<0,001), como para os de TNF-α ([B]; F1,39=235,16, p<0,001), sendo que, em ambos os genótipos, os animais tratados com LPS apresentaram maiores níveis dessas citocinas. Dados representados como média ± erro padrão. *** p<0,001.



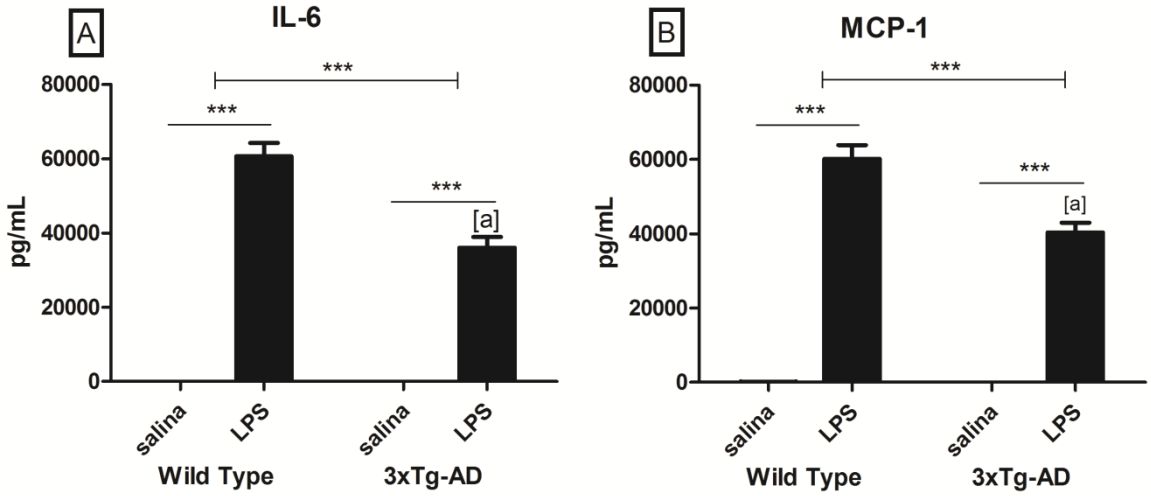

Com relação aos níveis de IL-10, uma citocina de perfil antiinflamatório, novamente detectou-se apenas um efeito do tratamento do LPS: maiores níveis dessa citocina foram encontrados em camundongos tratados com LPS, independente do genótipo (Figura – 28).

Figura 28 – Níveis séricos (pg/mL) de IL-10 em camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de 12 meses de idade, após administração de salina ou LPS. ANOVA de 2 vias demonstrou que houve efeito do tratamento (F1,39=128,41, p<0,001), sendo que, em ambos os genótipos, os animais tratados com LPS apresentaram maiores níveis dessas citocinas. Dados representados como média ± erro padrão. *** p<0,001.



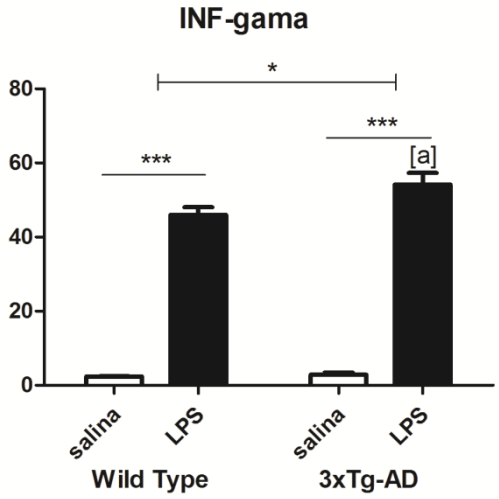
Os resultados de IL-6 e MCP-1 apresentaram-se de forma semelhante. Os níveis desses mediadores inflamatórios foram maiores nos camundongos tratados com LPS. Porém, houve um efeito do genótipo, sendo que camundongos 3xTg-AD apresentaram menor aumento após estimulação com LPS (Figura – 29).

Figura 29 – Níveis séricos (pg/mL) de IL-6 [A] e MCP-1 [B] em camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de 12 meses de idade, após administração de salina ou LPS. ANOVA de 2 vias demonstrou que houve efeito do tratamento tanto para os níveis de IL-6 ([A]; $F_{1,39}$=444,77, p<0,001), como para os de MCP-1 ([B]; $F_{1,39}$=520,88, p<0,001), sendo que, em ambos os genótipos, animais tratados com LPS apresentaram maiores níveis dessas citocinas. Além disso, houve um efeito do genótipo em ambos os casos: para IL-6, $F_{1,39}$=28,87, p<0,001 e para MCP-1, $F_{1,39}$=20,59, p<0,001), sendo que, após o tratamento com LPS, camundongos 3xTg-AD apresentaram menor aumento desses mediadores, com relação aos animais Wild Type. Dados representados como média ± erro padrão. *** p<0,001. [a] p<0,001, com relação ao grupo Wild Type com mesmo tratamento.



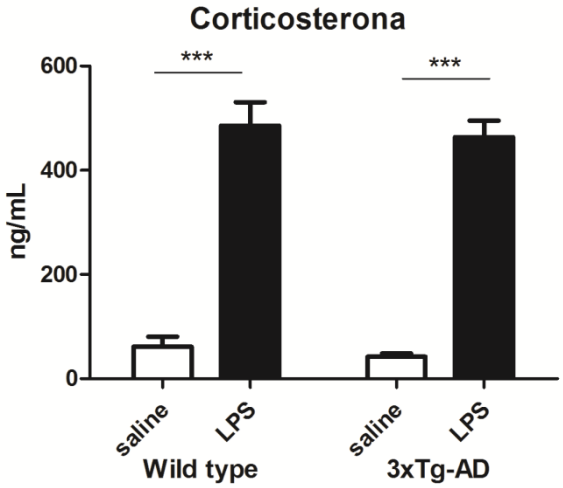

Os níveis de INF-γ também apresentaram maiores níveis nos animais tratados com LPS. Entretanto, nos camundogos 3xTg-AD, esses níveis foram maiores do que nos animais Wild Type (Figura – 30).

Figura 30 – Níveis séricos (pg/mL) de INF-γ em camundongos Wild Type e 3xTg-AD, de 12 meses de idade, após administração de salina ou LPS. ANOVA de 2 vias demonstrou que houve efeito do tratamento ($F_{1,39}$=561,54, p<0,001) e do genótipo ($F_{1,39}$=4,70, p<0,05). Camundongos 3xTg-AD tratados com LPS apresentaram maior aumento do que animais Wild Type, sob o mesmo tratamento (p<0,01). Dados representados como média ± erro padrão. *p<0,05. *** p<0,001. [a] p<0,01, com relação ao grupo Wild Type com mesmo tratamento.



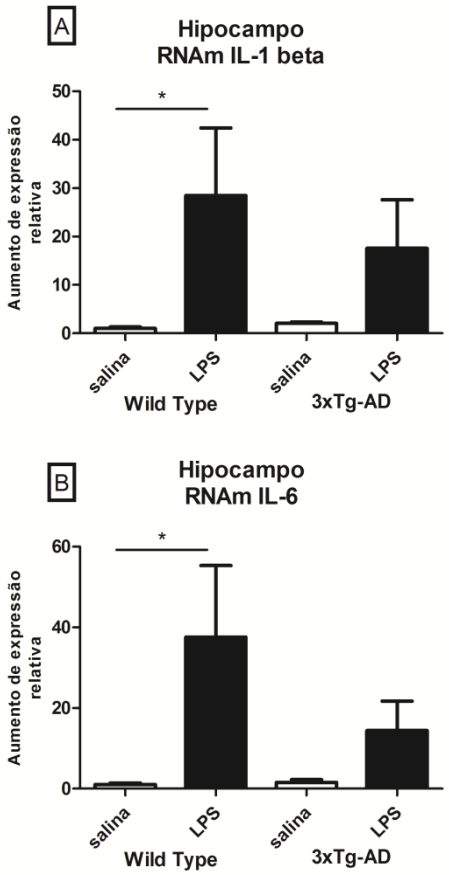

As mesmas amostras da dosagem de citocinas foram submetidas à analise de corticosterona sérica. O tratamento com LPS induziu aumento semelhante nos níveis de corticosterona sérica em camundongos Wild Type e 3xTg-AD (Figura – 31).

Figura 31 – Níveis de corticosterona após administração de salina ou LPS nos camundongos Wild Type e 3xTg-AD de 12 meses de idade. ANOVA de 2 vias demonstrou que houve um efeito do tratamento ($F_{1,39}=180,9$, $p<0,001$). Independente do genótipo, camundongos tratados com LPS apresentaram maiores níveis de corticosterona sérica do que animais tratados com salina ($p<0,001$ para ambos genótipos). Dados representados como média ± erro padrão. ***$p<0,001$.




Por fim, analisamos a expressão de IL-1β e IL-6 no hipocampo. A figura – 32 mostra o aumento de expressão dessas citocinas, com relação ao grupo Wild Type de 12 meses de idade. O tratamento com LPS aumentou a expressão de IL-1β e IL-6 no hipocampo em ambos os genótipos. Entretanto, o aumento só significante nos camundongos Wild Type.

Figura 32 – Expressão de IL-1β [A] e IL-6 [B] após administração de salina ou LPS nos camundongos Wild Type e 3xTg-AD de 12 meses de idade. ANOVA de 2 vias demonstrou que houve efeito do tratamento na expressão de IL-1β ([A]; F,=, p<0,0), e de IL-6 ([B]; F,=, p<0,0). Entretanto, pos testes de Bonferroni demonstraram que apenas os camundongos Wild Type tratados com LPS apresentaram aumento de expressão de IL-1β e IL-6 (p<0,05, para ambos). Dados representados como média ± erro padrão. *p<0,05.



# 6 DISCUSSÃO

A Doença de Alzheimer é a causa mais freqüente de demência senil, e sua prevalência aumentou significativamente com o aumento da expectativa de vida (BENNETT, 2000; SELKOE, 2001b). Trata-se de uma doença neurodegenerativa que leva a um declínio cognitivo progressivo, tornando o paciente completamente dependente de cuidados após alguns ou vários anos do diagnóstico clínico. O impacto econômico dos cuidados com o paciente com demência supera os gastos com pacientes com câncer ou doenças cardiovasculares, e especula-se que o custo anual de um paciente com demência seja de 20 mil Euros (HAMPEL et al., 2011).

As características neuropatológicas da doença são as placas amilóides (compostos por peptídeo β-amilóide) e os emaranhados neurofibrilares (constituídos por proteína tau fosforilada) (SELKOE, 2001b). Além dessas alterações, e talvez como conseqüência delas, há ativação da microglia e produção de mediadores inflamatórios no cérebro (VEHMAS et al., 2003). Acredita-se que a neuroinflamação participe da patogênese da doença, uma vez que a produção de mediadores inflamatórios resulta em dano neuronal e, talvez, em maior produção de peptídeo β-amilóide (LEE et al., 2010).

O diagnóstico definitivo da doença só pode ser realizado na avaliação *pós-mortem*; e o diagnóstico clínico, em geral, só é realizado após um longo período do início da patogenia (HAMPEL et al., 2011). Isso motivou o desenvolvimento de modelos animais, principalmente modelos murinos, como alternativa para o estudo da doença.

Um desses modelos é o camundongo utilizado no presente estudo. O camundongo 3xTg-AD contempla as patologias β-amilóide e tau, e as desenvolve de forma progressiva. Além disso, verificou-se que esse camundongo também apresentou aumento de mediadores inflamatórios no cérebro (JANELSINS et al., 2005).

Como alterações imunológicas periféricas também foram detectadas em pacientes com Alzheimer (LEE et al., 2009; RAY et al., 2007), o presente estudo pretendeu investigar como as alterações no sistema nervoso central interagem com o sistema imunológico periférico nos camundongos 3xTg-AD.

Este estudo foi dividido em algumas etapas. Primeiramente, estudamos a memória espacial e alguns aspectos comportamentais dos camundongos 3xTg-AD, como forma de validação do modelo (validação dos sinais e sintomas neste camundongo). Ainda como parte da validação, avaliamos a presença do peptídeo β-amilóide em diversas áreas do cérebro neste camundongo. Por fim, procedemos com o estudo de alguns aspectos da imunidade periférica, levando em consideração a neuroinflamação presente neste camundongo.

A discussão dos resultados será primeiramente abordada em etapas, para então finalizarmos em uma conclusão mais abrangente.

## 6.1 Teste do labirinto de Barnes evidenciou que camundongos 3xTg-AD exibem distúrbios cognitivos e comportamentais em estágios iniciais da doença

Neste estudo, a memória espacial de camundongos 3xTg-AD foi investigada em um teste com poucos estímulos estressores, o teste do LB (BARNES, 1979), em um modelo longitudinal. Clinton et al. (2007) demonstraram que o labirinto aquático de Morris induziu níveis de corticosterona plasmática mais altos nos camundongos 3xTg-AD, especialmente nas fêmeas, e que essa hiperatividade do eixo HPA pode ter contribuído para déficits cognitivos no camundongo 3xTg-AD (CLINTON et al., 2007). Além disso, habilidades de natação (PIETROPAOLO; FELDON; YEE, 2008), estratégias de procura (GIMENEZ-LLORT al., 2010), ou velocidade de natação (GARCIA-MESA et al., 2011), podem estar prejudicadas em camundongos mais velhos, tornando a interpretação dos resultados difícil (PIETROPAOLO; FELDON; YEE, 2008). Portanto, nos perguntamos se déficits cognitivos estariam presentes em camundongos 3xTg-AD em uma situação com poucos estímulos estressores, e que não requer natação.

Camundongos 3xTg-AD e Wild Type foram testados no LB, em um modelo longitudinal, aos 4, 6 e 12 meses de idade. Como enfatizado por Janus e Westaway (2001), abordagens longitudinais deveriam ser encorajadas para validação de modelos animais da Doença de Alzheimer (JANUS; WESTAWAY, 2001).

Observamos que ambos os grupos foram capazes de aprender e lembrar a localização do furo alvo durante os treinamentos, demonstrando que em situações pouco estressantes, camundongos 3xTg-AD não demonstram déficits de aquisição. Surpreendentemente, aos 6 meses de idade, os camundongos pareciam lembrar a localização da caixa de escape, como demonstrado pela baixa latência primária no D1 para ambos os grupos. Além disso, a distância primária dos 3xTg-AD foi menor no D1 e no D3, independente da idade.

Billings et al. (2007) demonstraram que exposições repetidas ao labirinto aquático de Morris (aos 2, 6, 9, 12, 15 e 18 meses de idade) melhoraram a aquisição e a retenção da memória nos camundongos 3xTg-AD, quando a localização da plataforma de escape variava para cada idade. Entretanto, o desempenho dos camundongos 3xTg-AD foi similar ao grupo controle de mesma idade, quando ambos os grupos eram pré-treinados (BILLINGS et al., 2007). Neste estudo, observamos que, quando a localização da caixa de escape no LB permanecia constante, camundongos 3xTg-AD demonstraram parâmetros de aquisição melhores (distância primária), comparado com WT no D3. Não sabemos se isso poderia representar um efeito de excesso de treinamento, que poderia induzir um melhor desempenho pelos camundongos 3xTg-AD.

Diferenças no D1 (menor distância primária dos camundongos 3xTg-AD) provavelmente foram devido ao comportamento de *freezing* aos 4 e 12 meses de idade. Neste sentido, a distância primária foi menor no 3xTg-AD no D1, enquanto que a latência primária foi maior: camundongos 3xTg-AD permaneciam imóveis por um grande período do teste e portanto tinham menos tempo para procurar o furo alvo no D1. Isto não se aplica aos camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade, que não exibiram velocidade reduzida no D1 e pode demonstrar um desempenho melhor dos camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade no D1.

O *Freezing* faz parte dos comportamentos defensivos associados a eventos ameaçadores (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003). *Freezing* nos camundongos 3xTg-AD também foi demonstrado aos 6 (ESPANA et al., 2010; GIMENEZ-LLORT et al., 2007), 7,5 a 11 (STERNICZUK et al., 2010), 12 (GIMENEZ-LLORT et al., 2007) e 15 meses de idade (GIMENEZ-LLORT et al., 2008), e pode estar relacionado à neofobia (GIMENEZ-LLORT et al., 2008). A neofobia representa uma falta de habilidade de lidar com estressores moderados, e parece mimetizar

alguns dos sintomas comportamentais e psicológicos de demência descritos em pacientes com Alzheimer (GIMENEZ-LLORT et al., 2008).

O comportamento de *Freezing* foi observado já aos 4 meses de idade nos camundongos 3xTg-AD, e também estava presente aos 6 e 12 meses de idade, em concordância com a literatura. Aos 6 meses de idade, camundongos 3xTg-AD demonstraram *freezing* no CA, mas não no LB. Acreditamos que, nesta idade, os camundongos ainda se lembravam do LB (uma vez que encontraram o furo alvo facilmente no D1). Portanto, aos 6 meses de idade, a neofobia a um novo ambiente foi exibida somente no CA.

España et al. (2010) demonstraram que o comportamento de *freezing* coincidiu com acúmulo de peptídeo β-amilóide em neurônios glutamatérgicos da amígdala basolateral em camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade. Exames *pós-mortem* de pacientes com Alzheimer também detectaram peptídeo β-amilóide intracelular em neurônios da amígdala. De forma semelhante, observamos marcação para 6E10 intraneuronal na amígdala nos camundongos 3xTg-AD aos 4, 6 e 12 meses de idade, quando também houve comportamento de *freezing*.

Além disso, tratamento com compostos ansiolíticos reduziu o comportamento de *freezing* em camundongos $APP_{Ind}$ (ESPANA et al., 2010), um outro modelo da doença. Portanto, o *freezing* também tem sido associado à maior ansiedade nos modelos murinos da Doença de Alzheimer (ESPANA et al., 2010).

Observamos que, em todas as idades estudadas, camundongos 3xTg-AD gastaram a mesma quantidade de tempo no compartimento claro, comparado com Wild Type, mas fizeram menos cruzamentos entre os dois compartimentos. Menor quantidade de transições pode indicar níveis mais altos de ansiedade em camundongos (BAILEY; CRAWLEY, 2009). Não sabemos se isso poderia ser interpretado como ansiedade ou locomoção alterada nos 3xTg-AD. Aos 6 e 12 meses de idade, camundongos 3xTg-AD exibiram maior latência para entrar no compartimento escuro. Entretanto, trabalhos prévios (GIMENEZ-LLORT et al., 2007) demonstraram que, quando introduzidos no escuro, fêmeas 3xTg-AD de 12 meses de idade exibiram maior latência para entrar no compartimento claro. Talvez, latências maiores foram decorrências do comportamento de *freezing* exibido por camundongos 3xTg-AD. Por outro lado (ou adicionalmente), camundongos 3xTg-AD poderiam demorar mais para sair do compartimento mais familiar (no presente caso,

o claro), e entrar no ambiente novo, não familiar (no presente caso, o compartimento escuro); e que isso depende mais da novidade do que da iluminação do ambiente.

Interessantemente, o comportamento semelhante à ansiedade e de *freezing* aumentaram com a idade em ambos os grupos, mas eram maiores nos camundongos 3xTg-AD mais cedo. O mesmo ocorreu para o número de acesso de risco (comportamento associado à avaliação de uma situação de perigo) (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003), porém, em menor grau. Talvez, camundongos 3xTg-AD apresentem um fenótipo de emocionalidade comparável a camundongos Wild Type mais velhos.

Distúrbios de atividade (perambular para longe de casa, comportamentos inapropriados e sem finalidade) são bem documentados em pacientes com Alzheimer, especialmente em estados moderados (EUSTACE et al., 2002; GALLAGHER et al., 2011). Neste trabalho, observamos que camundongos 3xTg-AD exibiram alguns comportamentos peculiares no LB após encontrar o furo alvo. Isto estava presente aos 4 e especialmente aos 6 meses de idade, em que camundongos 3xTg-AD continuavam explorando furos não alvo e a se locomover no labirinto, mesmo após encontrar o furo alvo. Não entrar na caixa de escape não era um comportamento incomum para ambos os grupos. Mas os 3xTg-AD, especialmente os camundongos de 6 meses de idade, realizaram mais erros secundários e exibiram maior distância secundária. Além disso, aos 12 meses de idade, alguns camundongos 3xTg-AD que não conseguiam encontrar o furo alvo rapidamente, sentavam do lado de um furo não alvo, realizando deflexões de cabeça persistentes (resultado não apresentado). Este comportamento peculiar poderia assemelhar-se aos comportamentos sem finalidade exibidos por pacientes com Doença de Alzheimer, apesar desta afirmação ser muito prematura, já que também pode representar uma falta de habituação ao labirinto.

O melhor desempenho dos camundongos 3xTg-AD no D3 (distância primária reduzida) também foi verificado no Teste Prova. Entretanto, enquanto os camundongos 3xTg-AD encontraram o furo alvo percorrendo menores distâncias, eles demonstraram uma procura seletiva pior ao furo alvo.

Aos 4 e 6 meses de idade (idades em que encontramos marcações positivas intracelulares no hipocampo, córtex e amígdala), a procura seletiva pelo furo alvo foi melhor nos Wild Type do que nos camundongos 3xTg-AD de mesma idade. Em concordância com os resultados apresentados, Billings et al. (2005) demonstraram

que camundongos 3xTg-AD de 4 meses de idade apresentaram déficits de retenção da memória de longo prazo no Labirinto Aquático de Morris, idade em que se detectou peptídeo β-amilóide intracelular no hipocampo e amígdala. Entretanto, assim como no presente trabalho, nessa idade não foram encontrados déficits de aquisição (durante os dias de treino).

Ainda, durante o teste prova do Labirinto Aquático de Morris, Billings et al. (2005) verificaram que, no teste prova, camundongos 3xTg-AD de 4 meses apresentaram déficits na localização específica da plataforma, mas não de sua localização geral. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho. A figura – 11 mostra que, em todas as idades avaliadas, apesar da pior busca seletiva em relação aos camundongos Wild Type, camundongos 3xTg-AD apresentaram maior número de buscas ao furo e aos furos adjacentes ao furo alvo alvo (assim como os Wild Type).

A maioria dos trabalhos demonstraram déficits dos 3xTg-AD no labirinto aquático de Morris iniciando aos 6 meses de idade (BILLINGS et al., 2007; CLINTON et al., 2007; ESPANA et al., 2010; GIMENEZ-LLORT et al., 2007). De forma semelhante, encontramos pior procura seletiva ao furo alvo nos camundongos 3xTg-AD aos 6 meses de idade, mas também aos 4 meses de idade.

Aos 12 meses de idade (quando encontramos marcações intracelulares em todas as regiões avaliadas e depósitos extra-celulares no hipocampo e no córtex), déficits nos camundongos 3xTg-AD foram mais proeminentes, mas similares àqueles dos camundongos Wild Type.

Esses resultados demonstram que os camundongos 3xTg-AD eram capazes de lembrar a localização do furo alvo, mas uma vez que não encontravam a caixa de escape, estavam menos seguros de sua localização.

Além das diferenças de genótipo, parece existir um déficit dependente da idade na retenção de memória no LB, como demonstrado pelos déficits graduais em muitos parâmetros.

Em suma, observamos que, em situações com poucos estímulos estressores, camundongos 3xTg-AD apresentaram déficits de retenção de memória já aos 4 meses de idade. O comportamento de *freezing* (provavelmente relacionado à neofobia), também foi detectado à partir desta idade e parece ser uma característica importante deste camundongo. Além disso, camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade apresentaram alterações de atividade e exploração.

## 6.2 Camundongos 3xTg-AD apresentam acúmulo de peptídeo β-amilóide e/ ou APP de forma dependente da idade e da região cerebral

Atualmente, a teoria mais aceita sobre as causas da neurodegeneração na Doença de Alzheimer é a hipótese da cascata amilóide (HARDY; HIGGINS, 1992; HARDY; SELKOE, 2002). Essa hipótese fornece explicações contundentes quanto à progressão da doença e à manifestação dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes.

Na hipótese da cascata amilóide ocorreria aumento na produção de peptídeo β-amilóide (principalmente na forma $A\beta_{42}$) e seu acúmulo, decorrente, por exemplo, de mutações nos genes da APP ou da PS1 e PS2. A seqüente deposição do peptídeo em forma de placas induziria injúria sináptica e neurítica progressiva, com conseqüente alteração na homeostase iônica de neurônios e injúria oxidativa. O desbalanço iônico promoveria alteração na atividade de quinases e fosfatases, causando hiperfosforilação de proteína tau e formação de emaranhados neurofibrilares. Isso resultaria em disfunção neuronal, morte celular e déficits de neurotransmissores. O resultado final seria a manifestação de demência (HARDY; HIGGINS, 1992; HARDY; SELKOE, 2002). Adicionalmente, ocorreria ativação de astrócitos e microglia (em resposta ao peptídeo β-amilóide) com produção de citocinas e fatores do sistema complemento, que induziria dano neuronal adicional (HARDY; SELKOE, 2002).

A principal objeção contra essa hipótese é a falta de correlação clara entre a quantidade de depósitos β-amilóide e o grau de déficit cognitivo. De fato, muitos exames *pós-mortem* demonstraram placas do peptídeo em humanos que não apresentavam sintomas. Como no cérebro desses indíduos observou-se pouca ativação de células da glia, acredita-se que a microglia e os astrócitos tenham participação importante na progressão da doença (EL KHOURY, 2010; HARDY, 2002). Dessa forma, indivíduos que possuam placas amilóides na ausência de microglia ativada, poderiam ser poupados dos sintomas de demência, já que o dano neuronal nesses casos seria menos evidente.

Apesar de não contemplar todos os aspectos e variações da Doença de Alzheimer, a hipótese da cascata amilóide continua sendo a mais aceita para explicar a neurodegeneração e os sintomas apresentados pelos pacientes. Portanto,

o uso de camundongos transgênicos que apresentam β-amiloidogênese representa uma ferramenta útil para o estudo da Doença de Alzheimer.

No presente estudo, as análises de imunohistoquímica do cérebro dos camundongos 3xTg-AD demonstraram marcações positivas para o anticorpo 6E10 em diversas regiões cerebrais já à partir de 4 meses de idade. Entretanto, o número de neurônios marcados e a localização da marcação (se dentro ou fora da célula), parecem depender da região cerebral e da idade do camundongo.

Aos 4 meses de idade, verificamos que marcações positivas encontravam-se exclusivamente dentro de neurônios. Elas foram detectadas em grande quantidade no hipocampo e amígdala, e em menor grau no córtex. Os pesquisadores que desenvolveram o modelo 3xTg-AD também observaram acúmulo de peptídeo β-amilóide intraneuronal no neocórtex aos 4 meses de idade, que se correlacionava com déficits na plasticidade sináptica (ODDO et al., 2003).

Inicialmente, acreditava-se que a geração do peptídeo β-amilóide ocorria na membrana plasmática, momentos antes da sua secreção. No meio extracelular, o peptídeo se agregaria, formando placas insolúveis que seriam responsáveis pela patogênese da doença. A associação inicial entre a patogênese da doença somente com as placas amilóides extracelulares ocorreu devido à escassez de técnicas que permitissem a detecção do peptídeo dentro da célula (e não de toda proteína APP). Com o desenvolvimento de anticorpos específicos para a região C-terminal (carboxila) do peptídeo β-amilóide, demonstrou-se que neurônios contem oligômeros e protofibrilas de β-amilóide no meio intracelular. A associação desses oligômeros intraneuronais com déficits de memória e aprendizado e disfunção sináptica chamou a atenção para a importância do peptídeo no meio intracelular (GOURAS; ALMEIDA; TAKAHASHI, 2005). Verificou-se que os locais de armazenamento/ produção do peptídeo dentro da célula parecem ser o retículo endoplasmático, complexo de golgi e o sistema endolisossomal e que o peptídeo intracelular parece ser uma das fontes de peptídeo extracelular (GOURAS; ALMEIDA; TAKAHASHI, 2005).

Billings et al. (2005) verificaram que, em camundongos 3xTg-AD, a imunoterapia com anticorpo contra o peptídeo β-amilóide reduziu a quantidade do peptídeo, ambos nos meios extra e intra-celular. Após a queda dos níveis séricos do anticorpo, o peptídeo reapareceu, sendo detectado primeiramente no meio intracelular neuronal, e então fora das células. Esses resultados fornecem

evidências de que o peptídeo β-amilóide intraneuronal seja uma das fontes para o seu acúmulo extra-celular (BILLINGS et al., 2005)..

Os mecanismos responsáveis pela alteração na distribuição do peptídeo do meio intracelular para o extracelular não são conhecidos. Especula-se que diferenças na propriedade da membrana celular neuronal devido à idade sejam responsáveis pela passagem do peptídeo do interior para fora da célula (DEANE et al., 2004). Ainda, a crescente produção de oligômeros do peptídeo poderia induzir formação de canais na membrana, permitindo a passagem deste peptídeo, ou que o mesmo seja capaz de se ligar a transportadores ou receptores na membrana plasmática (como o LRP, proteína relacionada ao receptor de LDL) (BILLINGS et al., 2007; DEANE et al., 2004). Adicionalmente, o peptídeo poderia ser transportado a terminais sinápticos e liberados na fenda sináptica (ODDO et al., 2006a).

O papel patogênico do peptídeo intracelular não descarta participação do peptídeo no meio extracelular na progressão da doença, já que se demonstrou que o último também prejudica o aprendizado e a memória. Dessa forma, o peptídeo β-amilóide parece participar da patogênese da Doença de Alzheimer quando presente tanto no meio intra quanto extracelular (GOURAS; ALMEIDA; TAKAHASHI, 2005).

Aos 6 meses, encontramos uma distribuição de marcação semelhante aos 4 meses de idade. Porém a quantidade de neurônios marcados parece ser maior aos 6 meses. Nessa idade, Billings et al. (2005) observaram depósitos extracelulares de peptídeo β-amilóide no neocórtex nesses camundongos. Neste trabalho, não encontramos depósitos extracelulares em nenhuma das regiões avaliadas aos 6 meses de idade. Outros estudos também não encontraram placas amilóides aos 6 meses de idade (HIRATA-FUKAE et al., 2008; OH; PEREZ; LAGALWAR, 2010; WINTON et al., 2011).

Hirata-Fukae et al. (2008) observaram placas amilóides no subículo aos 12 meses, e no hipocampo aos 14 meses. Mastrangelo e Bowers (2008) verificaram placas de peptídeo β-amilóide no subículo iniciando-se aos 15 meses de idade. Oh, Perez e Lagalwar (2010) observaram placas à partir de 8 meses de idade no subículo em camundongos 3xTg-AD fêmeas. Aos 18 meses, encontraram placas em fêmeas e machos no subículo e no hipocampo (OH; PEREZ; LAGALWAR, 2010). De fato, o desenvolvimento de placas nos camundongos 3xTg-AD parece variar entre diferentes colônias e laboratórios (OH; PEREZ; LAGALWAR, 2010).

No presente trabalho, observamos depósitos extracelulares à partir de 8 meses de idade, e também aos 12 meses. Além disso, aos 12 meses de idade, parecia haver menor número de neurônios marcados com o anticorpo na região CA1 do hipocampo. Oddo et al. (2006A) também observaram uma redução dependente da idade na quantidade de peptídeo intraneuronal no hipocampo. De forma inversa, ocorria o acúmulo extra-celular em camundongos de 12 meses de idade (ODDO et al., 2006a). Nessa idade, os oligômeros de β-amilóide pareciam ter saído do meio intracelular para atingir o meio extracelular (ODDO et al., 2006a). No presente trabalho, o mesmo parece ter ocorrido no hipocampo dos camundongos 3xTg-AD: inicialmente identificamos grande quantidade de neurônios positivos para 6E10, porém, aos 12 meses de idade, parece haver uma diminuição nesse número.

Os diferentes resultados quanto à idade em que as placas são encontradas nesse modelo murino podem ser devido às diferenças nos anticorpos utilizados (WINTON et al., 2011). Dessa forma, anticorpos que não sejam específicos para peptídeos livres (por exemplo, $A\beta_{40}$ ou $A\beta_{42}$) irão marcar tanto peptídeos como a proteína APP inteira, como é o caso do presente trabalho.

Nesta linha de raciocínio, Winton et al. (2011) verificaram que diferentes anticorpos resultavam em diferentes padrões de marcações no cérebro de camundongos 3xTg-AD. Para identificação do peptídeo livre, esses pesquisadores utilizaram anticorpos que reconhecem epítopos da região de clivagem após o processamento da APP (por exemplo, o anticorpo BC05, que detecta o peptídeo $A\beta_{42}$). Utilizando esse anticorpo, observaram depósitos extra-celulares de $A\beta_{42}$ (além da proteína APP) no hipocampo, aos 10 a 12 meses de idade, porém não encontraram marcação intraneuronal para $A\beta_{42}$ em nenhuma idade avaliada (WINTON et al., 2011). Dessa forma, marcações intraneuronais observadas aos 5 a 7 meses e aos 10 a 12 meses no córtex e hipocampo eram, provavelmente, relacionadas à proteína APP, e não ao peptídeo livre (WINTON et al., 2011).

Com a exceção de alguns trabalhos, como Mastrangelo e Bowers (2008), que identificaram marcações intraneuronais no hipocampo para peptídeo $A\beta_{42}$ à partir de 3 meses de idade, muitos trabalhos afirmaram observar marcações intraneuronais para o peptídeo β-amilóide (BILLINGS et al., 2005; ODDO et al., 2003; ODDO et al., 2006), porém não especificaram a região que o anticorpo utilizado reconhece. Desta forma, não é possível avaliar se a presença de marcação intraneuronal é constituída de peptídeos livres ou da proteína APP. No presente trabalho, utilizamos o anticorpo

6E10 que se liga a uma seqüência do peptídeo β-amilóide, que pode se encontrar tanto no peptídeo livre, como na proteína APP íntegra.

Portanto, as marcações intraneuronais aqui observadas podem ser derivadas tanto de peptídeo β-amilóide como de seu precursor não clivado. Porém, independente do tipo de material intraneuronal observado, verificamos alterações comportamentais que se relacionavam temporalmente com essas marcações. Dessa forma, trabalhos posteriores deverão atentar ao tipo de anticorpo utilizado, e, se verificado que o material intraneuronal é constituído de APP, estudar o papel patogênico do acúmulo intracelular dessa proteína no cérebro desses camundongos, e também em humanos.

Além das marcações no hipocampo, subículo e córtex, também detectamos marcações intraneuronais positivas na amígdala aos 4 e 6 meses, idade em que os camundongos apresentaram *freezing* e comportamentos semelhante à ansiedade. Aos 12 meses de idade, também encontramos marcações intraneuronais na amígdala, porém aparentemente em menor número. Adicionalmente, não foram observados depósitos extracelulares (como no córtex ou hipocampo) até os 12 meses de idade.

De forma semelhante, Mastrangelo e Bowers (2008) verificaram marcações positivas para o anticorpo 6E10 na amígdala à partir dos 6 meses de idade (não avaliaram aos 4 meses), até os 23 meses. Placas extracelulares de peptídeo β-amilóide ($A\beta_{42}$) foram encontradas somente aos 18 e 23 meses (MASTRANGELO; BOWERS, 2008). Neste mesmo trabalho, Mastrangelo e Bowers (2008) mostram uma figura na qual, aparentemente, a marcação intraneuronal com anticorpo 6E10 aos 12 meses de idade encontrava-se reduzida com relação à outras idades, muito embora não comentem no corpo do texto. Talvez, nessa idade, a expressão da APP esteja reduzida na amígdala; ou tenha sido processada em peptídeos não detectados pelo anticorpo 6E10.

Aos 12 meses de idade, o comportamento de *freezing* e comportamentos semelhantes à ansiedade nos camundongos 3xTg-AD foram mais evidentes do que aos 4 ou 6 meses de idade. Acreditamos que, independente de ter ocorrido uma redução da carga de peptídeo β-amilóide (ou APP) na amígdala ou não, a exposição crônica a esse material (dos 4 aos 12 meses de idade) promoveu danos neuronais responsáveis pelas alterações do comportamentos de *freezing* e de ansiedade. Neste sentido, Oh, Perez e Lagalwar, (2010) observaram que neurônios marcados

postivamente para o anticorpo 6E10, tanto na amígdala como em outras regiões, apresentaram alterações morfológicas, como encolhimento (OH; PEREZ; LAGALWAR, 2010), compatível com degeneração celular. Provavelmente, as alterações comportamentais detectadas no presente estudo não são resultado apenas do envelhecimento, uma vez que camundongos Wild Type de mesma idade não apresentaram alterações tão evidentes.

## 6.3 Alterações na expressão de APP e/ ou peptídeo β-amilóide não são acompanhadas por aumento de citocinas no hipocampo ou no sangue. Apesar disso, algumas alterações periféricas foram observadas no camundongo 3xTg-AD

Como abordado anteriormente, o Sistema Nervoso Central pode se comunicar com o sistema imune e vice-versa. Além disso, alterações endócrinas também influenciam fatores imunes e neurais, sendo a relação inversa também verdadeira. O estudo de possíveis alterações periféricas em pacientes com Alzheimer ou em modelos animais para a doença pode revelar distúrbios com potencial sistêmico importantes para a compreensão da patogenia da doença, e fornecer novos biomarcadores que auxiliem no diagnóstico precoce e guiem novas estratégias terapêuticas.

De acordo com essa visão, demonstrou-se que fagócitos mononucleares sanguíneos de indivíduos que possuem o alelo APOE4 produzem maior quantidade de óxido nítrico, assim como camundongos transgênicos que expressam esse alelo (COLTON et al., 2004). Como abordado anteriormente a presença do alelo APOE4 representa um fator de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer (CORDER et al., 1993). Ainda, foi demonstrado que células mononucleares periféricas de pacientes com Alzheimer apresentaram menor capacidade fagocítica (RICHARTZ et al., 2005) e que esses pacientes podem apresentar um fenótipo herdável pró-inflamatório, produzindo mais citocinas pró-inflamatórias e menos antiinflamatórias (REMARQUE et al., 2001). Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que muitos biomarcadores periféricos que poderiam ser utilizados no

diagnóstico precoce da doença estão envolvidos com processos inflamatórios (GOMEZ RAVETTI; MOSCATO, 2008; RAY et al., 2007).

Dessa forma, investigamos se o modelo murino 3xTg-AD também exibe possíveis alterações imunes detectadas no soro. Nossa hipótese era a de que esses camundongos apresentariam maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias, assim como muitos pacientes com Alzheimer. Os resultados dos experimentos 3 e 4 demonstraram que, em condições basais, ou seja, sem nenhum estímulo imunológico, não há maiores níveis séricos de citocinas/ quimiocinas pró-inflamatórias, nem redução de citocinas antiinflamatórias, em nenhuma das idades avaliadas.

Giménez-Llort et al. (2008) talvez tenha sido o primeiro grupo a estudar alterações neuro-imuno-endócrinas no modelo 3xTg-AD. Esses autores demonstraram que os níveis de TNF-α oriundos de linfócitos esplênicos eram maiores em camundongos 3xTg-AD idosos (15 meses de idade). Resultados nos níveis de IL-2 dependeram do gênero, sendo que aumentavam nas fêmeas idosas, e diminuíam nos machos de mesma idade (GIMENEZ-LLORT et al., 2008).

Subramanian et al. (2010) demonstraram maiores níveis esplênicos de IL-2 e IL-6 em camundongos 3xTg-AD (à partir de 5 a 6 meses de idade), e menores níveis de IL-10 (muito embora alterações nos níveis de IL-10 foram encontradas somente em fêmeas 3xtg-AD idosas). Além disso, também encontraram diferenças nas populações de linfócitos T no baço, com maior proporção de células $TCD8^+$ de memória, em detrimento de céluas $TCD4^+$ (SUBRAMANIAN et al., 2010). Os autores acreditam que vias imunológicas esplênicas poderiam agir sinergicamente com redes neurais, determinando a progressão da doença, nesse modelo (SUBRAMANIAN et al., 2010).

No presente trabalho, encontramos diferenças no peso relativo do baço, em que camundongos 3xTg-AD possuem maior peso desse órgão, especialmente aos 4 meses de idade. Embora seja apenas um achado anatômico, o mesmo demonstra que alterações esplênicas estão presentes nos camundongos 3xTg-AD. Além disso, os resultados do presente trabalho somados a dados da literatura demonstram que alterações nos níveis de citocinas e ou quimiocinas em camundongos 3xTg-AD (e talvez outros modelos murinos) podem ser encontradas em cultura de linfócitos esplênicos (com uma tendência a um aumento de citocinas de perfil Th1), mas não em níveis séricos, já que esses últimos apresentam-se muito baixos.

Dessa forma, nesse modelo murino, não encontramos alterações basais de citocinas sanguíneas que possam prever o curso da doença, ou servirem como biomarcadores periféricos da doença.

Compatível com os resultados séricos, não encontramos alterações na expressão de IL-1β ou IL-6 no hipocampo de camundongos 3xTg-AD, em nenhuma idade avaliada. Janelsins et al. (2005) demonstraram aumento na expressão de TNF-α e MCP-1 no córtex entorrinal de camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade. Análises no hipocampo não demonstraram alterações nos níveis de vários marcadores pró-inflamatórios analisados, aos 2, 3 e 6 meses de idade (JANELSINS et al., 2005). Como idades mais avançadas não foram estudadas por Janelsins et al. (2005), procedemos com análises de expressão de IL-1β e IL-6 no hipocampo, partindo dos 4 até 12 meses de idade. Apesar da intensa expressão de APP e/ou peptídeo β-amilóide no hipocampo dos camundongos 3xTg-AD, não observamos aumento na expressão dessas citocinas.

Como abordado anteriormente, as marcações positivas para 6E10 podem detectar tanto a proteína APP íntegra, ou peptídeo β-amilóide livre. Talvez, no presente estudo, o material detectado seja constituído por proteína APP. Nesse caso, o aumento de expressão dessa proteína não induziria uma resposta microglial, mesmo quando presente no meio extracelular. Alternativamente, Janelsins et al. (2005) demonstraram que a ativação da microglia ao peptídeo β-amilóide depende da região cerebral (JANELSINS et al., 2005). Apesar de encontrarem peptídeo β-amilóide tanto no córtex como no hipocampo, aumento da expressão de TNF-α e MCP-1 e microglia ativada foram verificados apenas no córtex-entorrinal aos 6 meses de idade. Dessa forma, é possível que essa característica se mantenha até os 12 meses de idade, nesse modelo murino.

Retomando as alterações imunológicas periféricas, o presente trabalho identificou menor peso relativo do timo em camundongos 3xTg-AD de 6 meses de idade, com relação ao seu controle Wild Type de mesma idade. Neste sentido, Xue et al. (2009) demonstraram uma diminuição no número de linfócitos T ($CD3^+$) periféricos em pacientes com Alzheimer. Esses autores acreditam que alterações no ambiente tímico possam ser responsáveis por essa diminuição (XUE et al. 2009). Dessa forma, o menor peso relativo do timo encontrado nos camundongos 3xTg-AD neste trabalho, pode ter implicações imunológicas importantes nesse modelo murino. Giménez-Llort et al. (2008) sugeriram que camundongos 3xTg-AD

apresentam um perfil de imunossenescência prematuro. O resultado do presente trabalho corrobora esta hipótese, uma vez que, apesar da involução tímica decorrente da idade ter ocorrido em ambos os genótipos, ela foi levemente superior nos camundongos 3xTg-AD.

Sabe-se que o fígado é o principal órgão responsável pela retirada de peptídeo β-amilóide do plasma (ROHER et al., 2009), e que essa atividade de *clearance* é mediada por LRP-1 (uma proteína relacionada ao receptor de LDL), no hepatócito (ZLOKOVIC et al., 2010). No presente estudo, verificamos maior peso relativo do fígado de camundongos 3xTg-AD, especialmente aos 6 e 12 meses de idade. Isso poderia ser decorrente de maior metabolismo hepático de peptídeo β-amilóide periférico nos camundongos transgênicos. Entretanto, para corroborar esta hipótese mais experimentos deveriam ser realizados como: verificar a presença de peptídeo β-amilóide e/ou APP na periferia nesses camundongos e o tipo de material acumulado no cérebro (se peptídeo β-amilóide livre, ou APP), tentando verificar a fonte de produção desse material.

Apesar de a obesidade ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de Alzheimer (MCNAULL et al., 2010), estudos recentes demonstraram que menores índices de massa corpórea (IMC) estavam relacionados com maior quantidade de placas amilóides e patologia tau, principalmente em estágios iniciais da doença (VIDONI et al., 2011). Além de menor IMC, muitos indivíduos em estágios iniciais de Alzheimer apresentaram sarcopenia acelerada e redução de tecido adiposo (VIDONI et al., 2011). Talvez esse paradoxo esteja relacionado a outro fator patogênico da obesidade: um estado pró-inflamatório, e não ao peso corpóreo ou quantidade de tecido adiposo em si.

Embora Giménez-Llort et al. (2010) tenham demonstrado maior peso corpóreo de camundongos 3xTg-AD aos 6 meses de idade, em comparação a seu controle Wild Type de mesma idade (GIMENEZ-LLORT et al., 2010), os resultados do presente trabalho corroboram o estudo de Vidoni et al. (2011). Camundongos 3xTg-AD apresentaram menor peso corpóreo com relação aos seus controles Wild Type. Essa característica esteve presente em todas as idades avaliadas. Também em concordância com os resultados do presente trabalho, Knight et al. (2012) demonstraram menor peso corpóreo e um estado hipermetabólico em camundongos 3xTg-AD de 12 e 18 meses de idade (outras idades não foram avaliadas, com exceção dos 2 meses, quando não encontraram alterações de metabolismo)

(KNIGHT et al., 2012). Como no presente trabalho foram encontradas alterações de peso corpóreo em todas as idades avaliadas, seria interessante verificar se alterações metabólicas estão presentes em camundongos mais jovens, ou seja, em estágios inicias da doença.

Esses resultados, em conjunto com dados da literatura, sugerem que exista uma alteração metabólica sistêmica em camundongos 3xTg-AD e em pacientes com Alzheimer, que pode ou não ser uma reação à doença.

Como abordado anteriormente, alterações endócrinas também podem influenciar a progressão de doenças neurodegenerativas, incluindo a Doença de Alzheimer. Nesse sentido, primeiramente avaliou-se os níveis basais de corticosterona em camundongos 3xTg-AD nas diferentes idades, e então após a administração de LPS. No momento, serão discutidos os resultados referentes aos níveis basais de corticosterona.

Como o estudo da Doença de Alzheimer se interpõe com as alterações decorrentes do envelhecimento, é importante realizar algumas considerações sobre alterações de glicocorticóides relacionadas à idade, antes de abordarmos os resultados referentes aos níveis de corticosterona.

Para explicar as ações deletérias à exposição crônica de glicocorticóides (relacionada ao envelhecimento) em neurônios cerebrais, Sapolsky, Krey e Mcewen, (1986) propuseram a “Hipótese da cascata de glicocorticóide”. Essa hipótese sugere que, com o envelhecimento, ocorreria dano neuronal em regiões hipocampais. Como o hipocampo participa do controle de feed back negativo do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, danos neuronais nessa região levariam à perda de controle do eixo HPA, resultando em maior produção de glicocorticóides pelas adrenais. Exposições crônicas a glicocorticóides causariam danos neuronais adicionais ao hipocampo, perpetuando o ciclo (LANDFIELD et al., 2007; SAPOLSKY; KREY; MCEWEN, 1986).

Sabe-se que pacientes com Alzheimer apresentam maiores níveis de glicocorticóides séricos, mesmo quando comparado com indivíduos sadios de mesma idade (FERRARI et al., 2000; UMEGAKI et al., 2000). Além disso, episódios estressores severos (como perda do cônjuge) aumentam as chances de um indivíduo desenvolver a doença (MEJIA et al., 2003), e tratamentos crônicos com glicocorticóides pioram a patologia em modelos animais (GREEN et al., 2006).

No presente trabalho, verificamos que camundongos 3xTg-AD de 4 meses de idade apresentaram menores níveis de corticosterona sérica. Não encontramos diferenças significativas nas outras idades avaliadas. Giménez-Llort et al. (2008) verificaram maiores níveis de corticosterona plasmática em machos 3xTg-AD de 15 meses de idade, comparado com seu controle Wild Type de mesma idade.

Não sabemos por que camundongos 3xTg-AD de 4 meses de idade apresentam menores níveis de corticosterona sérica. Não encontramos relatos de medidas de corticosterona nesse modelo murino, na mesma idade. Talvez, menores níveis de glicocorticóides seja uma característica de estágios iniciais da doença, nesse modelo. Já, com a progressão da doença, ocorreria aumento desses níveis (GIMENEZ-LLORT et al., 2008). Entretanto, existem relatos de maiores níveis de cortisol em indivíduos com MCI (déficits cognitivos leves), propensos a desenvolver Alzheimer (ARSENAULT-LAPIERRE et al., 2010; LIND et al., 2007). Ou seja, desde o início do desenvolvimento da doença, os pacientes podem apresentar hiperatividade do eixo HPA. Adicionalmente, a percepção do declínio cognitivo pelo paciente, nas fases iniciais da doença, pode gerar uma resposta de estresse, que resulta em aumento dos níveis de cortisol e agressividade nesses indivíduos.

Seria interessante analisar dosagens de corticosterona nos camundongos 3xTg-AD, em várias idades, incluindo dados de coleta ao longo do dia, uma vez que não só os níveis, como a amplitude do ciclo circadiano de cortisol parece estar alterada em pacientes com Alzheimer (FERRARI et al., 2000).

## 6.4 Alterações periféricas na resposta ao LPS parecem interferir na expressão de mediadores inflamatórios no SNC, mas não na ativação do eixo HPA

Sabe-se que a resposta de estresse e a estímulos imunológicos podem ativar o eixo HPA, resultando na liberação sistêmica de glicocorticóides. Neste sentido, Clinton et al. (2007) e Arranz et al. (2011) verificaram maiores níveis de corticosterona plasmática em camundongos 3xTg-AD submetidos a estímulos estressores (ARRANZ et al., 2011). Perguntamo-nos se a ativação do eixo HPA em camundongos 3xTg-AD seria diferente que seus controles Wild Type frente a um

estímulo imunológico, neste caso, o LPS. Portanto, neste trabalho, o LPS (administrado por via intraperitoneal) foi utilizado como um modelo de ativação do sistema imune inato (e suas conseqüências no Sistema Nervoso Central), e não como modelo de peritonite.

A administração periférica de LPS induz a produção de uma série de citocinas, dentre as quais se destaca IL-1β, IL-6 e TNF-α (DUNN, 2000). Outras citocinas também são produzidas, como será discutido posteriormente. A produção dessas citocinas induz a ativação do eixo HPA, que parece ser mediada por aumento na liberação de noradrenalina, serotonina e triptofano no cérebro. A IL-1β é a principal citocina responsável pela ativação do eixo HPA, embora IL-6 e TNF- α também exerçam uma relativa função (DUNN, 2000).

Um mecanismo de ação provável de ativação do eixo HPA seria a atuação de citocinas produzidas perifericamente em órgãos circunventriculares no cérebro. Nas células endoteliais dos capilares desses órgãos, ocorreria produção de prostaglandina $E_2$ que atingiria o hipotálamo, induzindo produção de Hormônio Liberador de Corticotrofinas (CRF, do inglês *Corticotropin Releasing Factor*). Seqüencialmente, ocorreria produção de Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*) pela hipófise, e então liberação de glicocorticóides sistemicamente pelas adrenais (DUNN, 2000). Vias alternativas de ativação do hipotálamo seriam vias neuronais, através de aferências do nervo vago, uma vez que a vagotomia subdiafragmática inibe a liberação de glicocorticóides periféricos (WATKINS; MAIER; GOEHLER, 1995). A liberação final de glicocorticóides impede que uma resposta inflamatória exacerbada se estabeleça (QUAN; HERKENHAM, 2002).

Neste trabalho, administramos LPS por via i.p. em camundongos 3xTg-AD e seu controle Wild Type, de 12 meses de idade. Selecionamos camundongos dessa idade, uma vez que encontramos depósitos extracelulares de APP e/ou peptídeo β-β-amilóide no córtex e hipocampo. Perguntamo-nos se esses depósitos poderiam influenciar a resposta ao LPS.

Os níveis de glicocorticóides séricos, induzidos pela administração periférica de LPS, não variaram entre camundongos 3xTg-AD e Wild Type de 12 meses de idade. Como a produção de glicocorticóides ocorre como uma resposta a aumento de níveis de citocinas periféricas, também verificamos a produção de mediadores inflamatórios no sangue.

Apesar da semelhança na ativação do eixo HPA entre camundongos 3xTg-AD e seu controle Wild Type, encontramos diferenças na produção de citocinas e quimiocinas entre os genótipos, tanto central como perifericamente, em resposta ao LPS.

A administração de LPS induz a produção de uma série de citocinas nos tecidos periféricos. Classicamente, ocorre a produção de TNF-α, IL-1β e IL-6 (DUNN, 2000; WATKINS et al., 1995). Além disso, administração de LPS por via ip em camundongos induz aumento dos níveis plasmáticos de INF-γ e IL-10 (FINNEY et al., 2012), MCP-1 (ZISMAN et al., 1997) e IL-12 (ROSSOL et al., 2011), além de outras citocinas (FINNEY et al., 2012; ROSSOL et al., 2011). Antes da discussão dos resultados de citocinas e quimiocina séricas, será realizada uma breve revisão sobre o papel das mesmas.

TNF-α pertence à superfamília TNF e é o protótipo de citocina pró-inflamatória, apresentando papel importante no choque séptico (ROSSOL et al., 2011). É produzida rapidamente por monócitos e macrófagos ativados, tendo seus níveis diminuídos após cerca de 1 hora (ROSSOL et al., 2011). Induz a produção de outras citocinas por macrófagos, como IL-1β e IL-6 (FEGHALI; WRIGHT, 1997), aumenta a fagocitose por essas células, e induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, participando do recrutamento de outros leucócitos para o local da lesão (ROSSOL et al., 2011). Também é importante no desenvolvimento da febre, por induzir expressão de prostaglandina E2 em células endoteliais de vasos do hipotálamo (DUNN, 2000; FEGHALI; WRIGHT, 1997).

A IL-1β pertence à família IL-1. Também participa da indução da febre, pelos mesmos mecanismos que TNF-α (FEGHALI; WRIGHT, 1997).. A produção de IL-1β ocorre em monócitos (e também em queratinócitos, fibroblastos e células T e B) e se inicia cerca de 2 horas após administração de LPS, continuando por horas (ROSSOL et al., 2011). A IL-1β induz a produção de IL-6, promove o recrutamento de outras células inflamatórias e estimula a proliferação de células T (FEGHALI; WRIGHT, 1997; ROSSOL et al., 2011).

A IL-6 pode ser produzida por monócitos e macrófagos (FEGHALI; WRIGHT, 1997), como resposta ao aumento de TNF-α e IL-1β, ou ao LPS (ROSSOL et al., 2011). Também pode ser produzida por outros tipos celulares, como fibroblastos, células T e B, queratinócitos, mastócitos e células endoteliais (ROSSOL et al., 2011). A IL-6 é um dos principais reguladores da resposta de fase aguda, induzindo

a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (FEGHALI; WRIGHT, 1997). Geralmente é considerada uma citocina pró-inflamatória, mas parece ter um papel antiinflamatório no choque séptico e na endotoxe (ROSSOL et al., 2011).

MCP-1, também conhecida como CCL2, é uma quimiocina, membro da subfamília CC (YADAV et al., 2010). É produzida principalmente por monócitos e macrófagos (mas também por células epiteliais e endoteliais, fibroblastos e células da glia) como resposta a aumento nos níveis de TNF-α, IL-1β e IFN-γ, ou ao próprio LPS (YADAV et al., 2010), sendo detectada cerca de 2 horas após a administração de LPS (ZISMAN et al., 1997). É responsável pelo recrutamento de outros tipos celulares ao tecido lesionado, como neutrófios, células T de memória, células dendríticas, basófilos e eosinófilos (FEGHALI; WRIGHT, 1997; YADAV et al., 2010). Apesar de suas propriedades pró-inflamatórias, a MCP-1 pode proteger contra a endotoxemia, mecanismo que parece ser mediado através de redução nos níveis de TNF-α e IL-12 (provavelmente diminuindo também a produção de IFN-γ), e aumento de IL-10 (ZISMAN et al., 1997).

A IL-12 também é conhecida por IL-12p70, referindo-se ao heterodímero formado por duas cadeias de pesos moleculares 35kDa (p35) e 40kDa (p40). É produzida principalmente por fagócitos (monócitos, macrófagos e neutrófilos) e células dendríticas em resposta ao LPS (GEE et al., 2009). Sua principal função é auxiliar a diferenciação de células *naive* em células Th1 efetoras, formando um elo entre a imunidade inata e a adaptativa (GEE et al., 2009; ROSSOL et al., 2011). Sob influência da IL-12, células Th1 e células NK produzem IFN-γ. Por sua vez, IFN-γ atua em monócitos e macrófagos, induzindo a produção de IL-12 adicional. Dessa forma, IL-12 e IFN-γ participam de um mecanismo de retroalimentação positiva, favorecendo a resposta Th1 (FEGHALI; WRIGHT, 1997; GEE et al., 2009; ROSSOL et al., 2011). Como controle de uma resposta Th1 exacerbada, a IL-10 inibe ações da IL-12, como será discutido adiante.

IFN-γ é produzido por células T ativadas e células NK, como resposta à IL-12 e, conjuntamente com IL-12 direciona a resposta a um fenótipo Th1 (SCHRODER et al., 2004). Induz a ativação de células NK, facilita a interação entre célula T e célula apresentadora de antígeno, ativa macrófagos (aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio nessas células) e induz a expressão de moléculas de adesão e produção de quimiocinas como MCP-1 por macrófagos (FEGHALI; WRIGHT, 1997; SCHRODER et al., 2004). IFN-γ pode reduzir os efeitos antiinflamatórios de IL-10

por diminuir os locais de ligação de IL-10 em suas células alvo, causando perda de responsividade das células à IL-10 (JI et al., 2003).

A IL-10 é produzida por monócitos e macrófagos após administrações de LPS (ROSSOL et al., 2011). Sua principal função é controlar a inflamação, estimulando a produção de moléculas antiinflamatórias (como IL-1ra, antagonista de receptor de IL-1, um fator solúvel que compete pelos sítios de ligação de IL-1α e IL-1β) e inibindo a expressão de genes codificadores de citocinas inflamatórias (como TNF-α, IL-1β, IL-12 e IFN-γ) (BAZZONI et al., 2010). Além disso, inibe o recrutamento de neutrófilos ao local da lesão (BAZZONI et al., 2010) e a proliferação de células T (FEGHALI; WRIGHT, 1997).

No presente trabalho, a administração intraperitoneal de LPS induziu o aumento da produção de todas as citocinas e quimiocina avaliadas, tanto em camundongos Wild Type, como nos 3xTg-AD, ambos com 12 meses de idade. Os níveis de TNF-α, IL-12p70 e IL-10 foram semelhantes nos dois genótipos. Já, o aumento dos níveis séricos de IL-6 e MCP-1 foi menor em camundongos 3xTg-AD. De forma contrária, os níveis de IFN-γ apresentaram-se maiores em camundongos 3xTg-AD após administração de LPS.

Como abordado anteriormente, a produção de IL-6 pode ser induzida por TNF-α e IL-1β. Apesar da semelhança no aumento dos níveis de TNF-α nos dois genótipos, encontramos menores níveis de IL-6 nos camundongos 3xTg-AD (dosagens de IL-1β não foram realizadas neste experimento). Já a quimiocina MCP-1, é produzida em resposta a aumento dos níveis de TNF-α, IL-1β e IFN-γ. Novamente, os níveis de TNF-α não estavam alterados em camundongos 3xTg-AD. Por outro lado, o aumento de IFN-γ foi maior do que em camundongos Wild Type. Ou seja, mesmo com maiores níveis de IFN-γ, camundongos 3xTg-AD produziram menor quantidade de MCP-1.

Não encontramos trabalhos na literatura que avaliaram os efeitos do LPS na produção de citocinas séricas nesse modelo murino. Entretanto, algumas especulações podem ser realizadas frente à menor produção de IL-6 e MCP-1 por camundongos 3xTg-AD. Como as principais células que produzem IL-6 e MCP-1 são monócitos e macrófagos, é possível que a resposta dessas células a TNF-α, IL-1β e IFN-γ esteja reduzida nesses camundongos. Não encontramos relatos sobre funções de monócitos ou macrófagos em camundongos 3xTg-AD na literatura. Já

em pacientes com Alzheimer, Richartz et al. (2005) verificaram menor capacidade fagocítica por células mononucleares periféricas.

Como, apesar de suas propriedades pró-inflamatórias, ambas IL-6 e MCP-1 protegem contra o choque endotóxico (ROSSOL et al., 2011; ZISMAN et al., 1997), é possível que camundongos 3xTg-AD sejam mais susceptíveis aos efeitos letais de endotoxinas. Adicionalmente, verificamos maiores níveis de IFN-γ, que poderiam contribuir para os efeitos deletérios de endotoxinas, uma vez que essa citocina promove o aumento dos níveis de IL-12 (FEGHALI; WRIGHT, 1997) e diminui a responsividade das células aos efeitos antiinflamatórios da IL-10 (JI et al., 2003). Entretanto, o aumento nos níveis de IFN-γ em camundongos 3xTg-AD não foi tão intenso como a redução de IL-6 e MCP-1. E, apesar do aumento de IFN-γ, não encontramos aumentos de IL-2, ao menos 3 horas após o tratamento com LPS. Como a produção de IFN-γ ocorre em células NK e linfócitos $TCD4^{+}$, seria interessante verificar a atividade dessas células nesse modelo murino.

Portanto, apesar de não encontrarmos um perfil pró-inflamatório evidente na resposta ao LPS em camundongos 3xTg-AD, foram detectadas algumas alterações que poderiam predispor esses animais ao choque endotóxico.

Como abordado, apesar das alterações nas citocinas séricas, não encontramos diferenças na ativação do eixo HPA: os níveis de corticosterona sérica foram semelhantes nos dois grupos. Seria interessante analisar se concentrações semelhantes de citocinas (principalmente, IL-1β, não avaliada no presente trabalho; e IL-6, cujos níveis apresentaram menor aumento) resultam em produção semelhante de corticosterona nesse modelo murino.

Como abordado, a ativação do sistema imunológico e produção de mediadores inflamatórios em tecidos periféricos promovem alterações no SNC, como ativação do eixo HPA (DUNN, 2000; WATKINS et al., 1995). Além de induzir a liberação de CRF pelo hipotálamo, a produção de citocinas séricas pode resultar em aumento de mediadores inflamatórios no próprio tecido neuronal (SZELENYI, 2001). Segundo Dantzer (2004), o cérebro reflete a resposta inflamatória periférica. Alguns mecanismos desse fenômeno foram propostos: 1) passagem de citocinas sanguíneas através dos órgãos circunventriculares no cérebro (desprovidos de barreira hemato-encefálica, ou seja, cujos capilares apresentam fenestrações) através de difusão ou transporte ativo; 2) indução da síntese de outros mediadores inflamatórios (como óxido nítrico ou ciclo-oxigenase 2) em células endoteliais, que

no tecido neuronal levaria a produção de citocinas por células da glia, células perivasculares ou mesmo as próprias células neuronais (SZELENYI, 2001); e 3) ativação do núcleo do trato solitário (através de vias vagais aferentes), com conseqüente sinalização em núcleos do hipotálamo e também na amígdala, induzindo uma resposta inflamatória nessas regiões (DANTZER, 2001). A presença de citocinas no SNC participa da ativação do eixo HPA, desenvolvimento da febre e comportamento doentio (DANTZER, 2001).

Além do hipotálamo e da amígdala, a administração periférica de LPS também induz produção de citocinas (TNF-α, IL-1β e IL-6) no hipocampo tanto em camundongos ( SPARKMAN et al., 2006; RICHWINE et al., 2009) como em ratos (BAY-RICHTER et al., 2011). A presença de citocinas no hipocampo está relacionada ao declínio da cognição, que acompanha o comportamento doentio (SPARKMAN et al., 2006). Neste trabalho, verificamos que a administração ip de LPS promoveu aumento de RNA mensageiro de IL-1β e IL-6 após 3 horas. Entretanto, pós testes demonstraram que o aumento foi significativo apenas em camundongos Wild Type.

Sparkman et al. (2006) demonstraram que a IL-6 periférica possui um papel importante na indução de IL-1β e TNF-α no hipocampo de camundongos. Após administrações periféricas de LPS, camundongos *knock-out* para IL-6 ($IL6^{-/-}$) não apresentaram aumento significante dessas citocinas no hipocampo como o grupo controle, apesar do evidente aumento de IL-1β e TNF-α no plasma (SPARKMAN et al., 2006). Portanto, a IL-6 parece facilitar processos inflamatórios no hipocampo (SPARKMAN et al., 2006).

Em concordância com Sparkman et al. (2006), verificamos que camundongos 3xTg-AD tratados com LPS apresentaram menores níveis circulantes de IL-6 e menor produção de IL-1β no hipocampo. Acreditamos que a IL-6 periférica também seja importante para a sua própria produção no hipocampo, uma vez que os níveis de RNA mensageiro de IL-6 também apresentaram menor aumento no hipocampo desses camundongos.

A figura – 33 resume os resultados dos níveis de citocinas séricas e expressão de mediadores inflamatórios no hipocampo, encontrados neste trabalho.

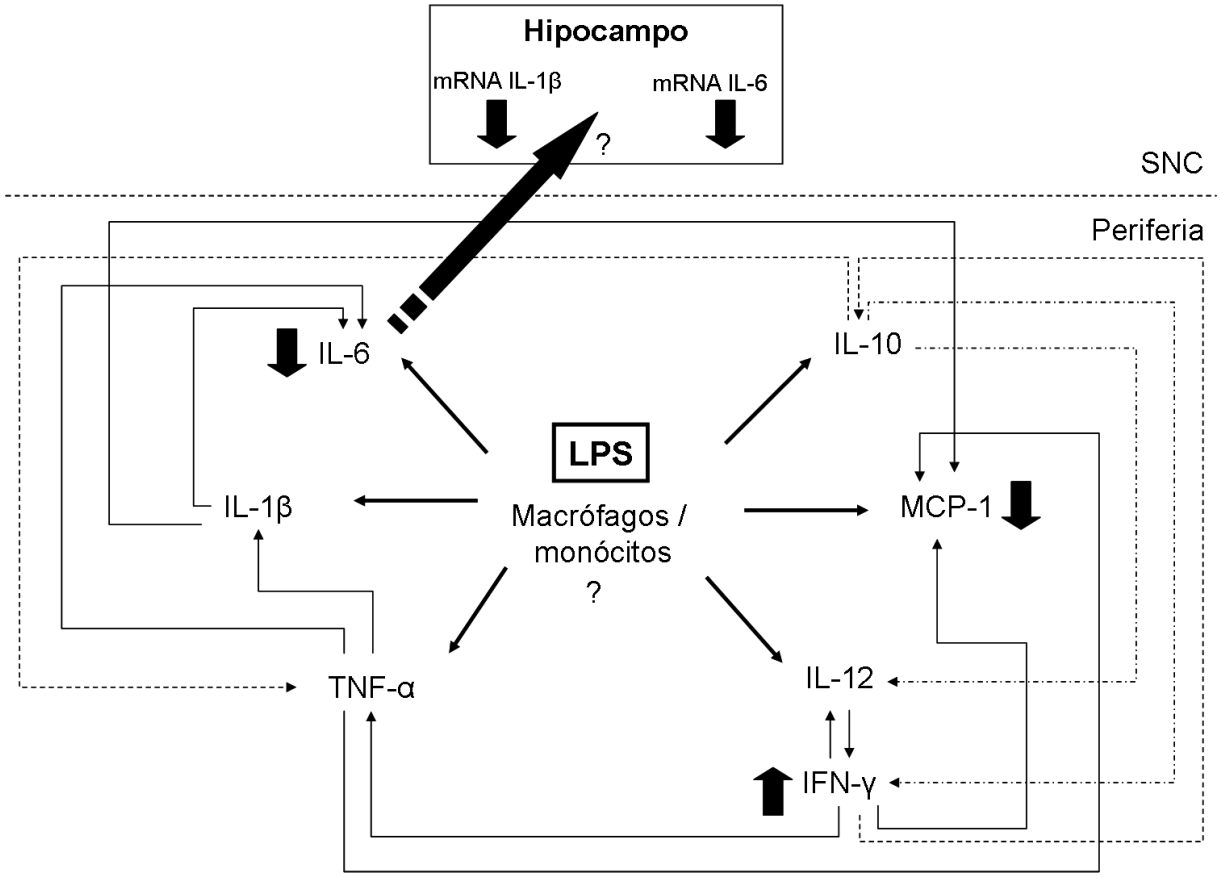



Figura 33 – Representação dos efeitos da administração i.p. de LPS na produção de citocinas periféricas e no SNC, em camundongos 3xTg-AD de 12 meses de idade. A parte superior demonstra os efeitos do LPS no SNC, mais especificamente no hipocampo; a parte inferior, os efeitos do LPS na periferia. As setas contínuas representam estimulação da produção ou dos efeitos da citocina/ quimiocina; as setas tracejadas, inibição da produção ou dos efeitos da citocina/ quimiocina; as setas largas (preenchidas), os resultados obtidos em camundongos 3xTg-AD de 12 meses de idade (apontando para cima: maiores níveis; para baixo, menores níveis, comparado ao grupo Wild Type de mesma idade); a seta larga com a base tracejada, sinalização entre IL-6 sérica e hipocampo. O ponto de interrogação no hipocampo se refere ao provável efeito da menor produção de IL-6 periférica na produção de RNAm de IL-1β e de IL-6 (também reduzidos no 3xTg-AD). O ponto de interrogação em Macrófagos / monócitos se refere à provável deficiência dessas células em produzir MCP-1 e IL-6.

## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que o camundongo 3xTg-AD é um modelo animal útil para o estudo da Doença de Alzheimer. Alterações cognitivas e comportamentais e a presença de APP e/ ou peptídeo β-amilóide em áreas cerebrais importantes para a doença (córtex, hipocampo, subículo e amígdala) mostraram que este camundongo apresenta sintomas e sinais de patologia β-amilóide relevantes, que podem validá-lo como um modelo murino da Doença de Alzheimer.

A presença marcante de APP e/ ou peptídeo β-amilóide no cérebro não induz um estado pró-inflamatório no hipocampo ou no sangue. Apesar disso, algumas alterações periféricas foram encontradas, demonstrando que a expressão de APP e/ ou de peptídeo β-amilóide por células neuronais possam causar distúrbios sistêmicos (endócrinos, metabólicos e imunológicos).

A resposta inflamatória de tecidos periféricos ao LPS apresentou um perfil dúbio: mediadores considerados pró-inflamatórios apresentaram tanto menor (IL-6 e MCP-1), como maior aumento (IFN-γ). Este perfil promoveu diferentes respostas no SNC: enquanto que a ativação do eixo HPA não foi modificada, a produção de citocinas inflamatórias no hipocampo foi atenuada. Portanto, nesse modelo, alterações na resposta periférica ao LPS parecem ser responsáveis por menor inflamação no hipocampo.

## REFERÊNCIAS

AKIYAMA H, BARGER S, BARNUM S, BRADT B, BAUER J, COLE GM, COOPER NR, EIKELENBOOM P, EMMERLING M, FIEBICH BL, FINCH CE, FRAUTSCHY S, GRIFFIN WS, HAMPEL H, HULL M, LANDRETH G, LUE L, MRAK R, MACKENZIE IR, MCGEER PL, O'BANION MK, PACHTER J, PASINETTI G, PLATA-SALAMAN C, ROGERS J, RYDEL R, SHEN Y, STREIT W, STROHMEYER R, TOOYOMA I, VAN MUISWINKEL FL, VEERHUIS R, WALKER D, WEBSTER S, WEGRZYNIAK B, WENK G, WYSS-CORAY T Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 3, p. 383-421, 2000.

ARSENAULT-LAPIERRE, G.; CHERTKOW, H.; LUPIEN, S. Seasonal effects on cortisol secretion in normal aging, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 6, p. 1051-1054, 2010.

AVAGYAN, H; GOLDENSON, B; TSE, E; MASOUMI, A; PORTER, V; WIEDAU-PAZOS, M; SAYRE, J; ONG, R; MAHANIAN, M; KOO, P; BAE, S; MICIC, M; LIU, P T; ROSENTHAL, M J; FIALA, M Immune blood biomarkers of Alzheimer disease patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 210, n. 1-2, p. 67-72, 2009.

BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N. Anxiety-related behaviors in mice. In: JJ, B. (Ed.). **Methods of behavior analysis in neuroscience**. 2. ed. Boca Raton : [s.n.], 2009. .

BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **Journal of Comparative & Physiological Psychology** v. 93, n. 1, p. 74-104, 1979.

BAY-RICHTER, C.; JANELIDZE, S.; HALLBERG, L.; BRUNDIN, L. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 193-199, 2011.

BAZZONI, F.; TAMASSIA, N.; ROSSATO, M.; CASSATELLA, M. A. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 9, p. 2360-2368, 2010.

BENNETT, D. A. Part I. Epidemiology and public health impact of Alzheimer's disease. **Disease a Month: DM**, v. 46, n. 10, p. 657-665, 2000.

BESEDOVSKY, H.; REY, A. DEL. Neuroendocrine and metabolic responses induced by interleukin-1. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, n. 1, p. 172-178, 1987.

BILLINGS, L. M.; GREEN, K. N.; MCGAUGH, J. L.; LAFERLA, F. M. Learning decreases A beta*56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 751-761, 2007.

BILLINGS, L. M.; ODDO, S.; GREEN, K. N.; MCGAUGH, J. L.; LAFERLA, F. M. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. **Neuron**, v. 45, n. 5, p. 675-688, 2005.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 97-116, 2003.

BLENNOW, K. Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1218-1222, 2010.

BO, R. DEL; ANGERETTI, N.; LUCCA, E.; SIMONI, M. G. DE; FORLONI, G. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and beta-amyloid production in cultures. **Neuroscience Letteters**, v. 188, n. 1, p. 70-74, 1995.

BOISSONNEAULT, V; FILALI, M; LESSARD, M; RELTON, J; WONG, G; RIVEST, S. Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on beta-amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 132, n. Pt 4, p. 1078-1092, 2009.

VAN BROECKHOVEN, C; HAAN, J; BAKKER, E; HARDY, J A; VAN HUL, W; WEHNERT, AVEGTER-VAN DER VLIS, M; ROOS, R A. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). **Science**, v. 248, n. 4959, p. 1120-1122, 1990.

BUEE, L.; BUSSIERE, T.; BUEE-SCHERRER, V.; DELACOURTE, A.; HOF, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 33, n. 1, p. 95-130, 2000.

CASTELLANO, J M; KIM, J; STEWART, F R; JIANG, H; DEMATTOS, R B; PATTERSON, B W; FAGAN, A M; MORRIS, J C; MAWUENYEGA, K G; CRUCHAGA, C; GOATE, A M; BALES, K R; PAUL, S M; BATEMAN, R J; HOLTZMAN, D M. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 89, p. 89ra57, 2011.

CHUNG, H Y; CESARI, M; ANTON, S; MARZETTI, E; GIOVANNINI, S; SEO, A Y; CARTER, C; YU, B P; LEEUWENBURGH, C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 18-30, 2009.

CITRON, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 5, p. 387-398, 2010.

CLINTON, L K; BILLINGS, L M; GREEN, K N; CACCAMO, A; NGO, J; ODDO, S; MCGAUGH, J L; LAFERLA, F M. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. **Neurobiology of Disease**, v. 28, n. 1, p. 76-82, 2007.

COLTON, C A; NEEDHAM, L K; BROWN, C; COOK, D; RASHEED, K; BURKE, J R; STRITTMATTER, W J; SCHMECHEL, D E; VITEK, M P. APOE genotype-specific differences in human and mouse macrophage nitric oxide production. **Journal of Neuroimmunology**, v. 147, n. 1-2, p. 62-67, 2004.

CORDER, E H ; SAUNDERS, A M; RISCH, N J; STRITTMATTER, W J; SCHMECHEL, D E; GASKELL JR., P C; RIMMLER, J B; LOCKE, P A; CONNEALLY, P M; SCHMADER, K E.; SMALL, G M; ROSES, A D; HAINES, J L; PERICAK-VANCE, M A. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. **Nature Genetics**, v. 7, n. 2, p. 180-184, 1994.

CORDER, E H; SAUNDERS, A M; STRITTMATTER, W J; SCHMECHEL, D E; GASKELL, P C; SMALL, G W; ROSES, A D; HAINES, J L; PERICAK-VANCE, M A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921-923, 1993.

CRESTANI, F.; SEGUY, F.; DANTZER, R. Behavioural effects of peripherally injected interleukin-1: role of prostaglandins. **Brain Research**, v. 542, n. 2, p. 330-335, 1991.

CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R1, p. R12-20, 2010.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain Behavior and Immunity**, v. 15, n. 1, p. 7-24, 2001.

DEANE, R; WU, Z; SAGARE, A;DAVIS, J; DU YAN, S; HAMM, K; XU, F; PARISI, M; LARUE, B; HU,; H W; SPIJKERS, P; GUO, H; SONG, X; LENTING, P J; VAN NOSTRAND, W E; ZLOKOVIC, B V. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. **Neuron**, v. 43, n. 3, p. 333-344, 2004.

DICKSON, D. W. The pathogenesis of senile plaques. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 56, n. 4, p. 321-339, 1997.

DUNN, A. J. Cytokine activation of the HPA axis. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 608-617, 2000.

DUYCKAERTS, C.; POTIER, M. C.; DELATOUR, B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. **Acta Neuropathologica**, v. 115, n. 1, p. 5-38, 2008.

EIKELENBOOM, P; BATE, C; VAN GOOL, W A; HOOZEMANS, J J; ROZEMULLER, J M; VEERHUIS, R; WILLIAMS, A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 232-239, 2002.

EL KHOURY, J. Neurodegeneration and the neuroimmune system. **Nature Medicine**, v. 16, n. 12, p. 1369-1370, 2010a.

ESPANA, J; GIMENEZ-LLORT, L; VALERO, J; MINANO, A; RABANO, A; RODRIGUEZ-ALVAREZ, J; LAFERLA, F M; SAURA, C A. Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 6, p. 513-521, 2010.
EUSTACE, A; COEN, R; WALSH, C; CUNNINGHAM, C J; WALSH, J B; COAKLEY, D; LAWLOR, B A. A longitudinal evaluation of behavioural and psychological

symptoms of probable Alzheimer's disease. **Internal Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 17, n. 10, p. 968-973, 2002.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. d12-26, 1997.

FERRARI, E.; FIORAVANTI, M.; MAGRI, F.; SOLERTE, S. B. Variability of interactions between neuroendocrine and immunological functions in physiological aging and dementia of the Alzheimer's type. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 582-596, 2000.

FINNEY, S. J.; LEAVER, S. K.; EVANS, T. W.; BURKE-GAFFNEY, A. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 38, n. 2, p. 324-332, 2012.

FISHER, A. Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 120 Suppl , p. 22-33, 2012.

FODERO-TAVOLETTI, M. T.; VILLEMAGNE, V. L.; ROWE, C. C. *et al.* Amyloid-beta: the seeds of darkness. **The Internal Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 9, p. 1247-1251, 2011.

FRANCESCHI, C; CAPRI, M; MONTI, D; GIUNTA, S; OLIVIERI, F; SEVINI, F; PANOURGIA, M P; INVIDIA, L; CELANI, L; SCURTI, M; CEVENINI, E; CASTELLANI, G C; SALVIOLI, S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, n. 1, p. 92-105, 2007.

GALIMBERTI, D.; SCARPINI, E. Progress in Alzheimer's disease. **Journal of Neurology**, 2011.

GALLAGHER D, COEN R, KILROY D, BELINSKI K, BRUCE I, COAKLEY D, WALSH B, CUNNINGHAM C, LAWLOR BA. Anxiety and behavioural disturbance as markers of prodromal Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. **Internal Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 166-172, 2011.

GARCIA-MESA, Y; LOPEZ-RAMOS, J C; GIMENEZ-LLORT, L; REVILLA, S; GUERRA, R; GRUART, A. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 24, n. 3, p. 421-454, 2011.

GEE, K.; GUZZO, C.; CHE MAT, N. F.; MA, W.; KUMAR, A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 40-52, 2009.

GIMENEZ-LLORT, L.; ARRANZ, L.; MATE, I.; FUENTE, M. DE LA. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 4-6, p. 331-343, 2008.

GIMENEZ-LLORT, L; BLAZQUEZ, G; CANETE, T; JOHANSSON, B; ODDO, S; TOBENA, A; LAFERLA, F M; FERNANDEZ-TERUEL, A. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 1, p. 125-147, 2007.

GIMENEZ-LLORT, L; GARCIA, Y; BUCCIERI, K; REVILLA, S; SUNOL, C; CRISTOFOL, R; SANFELIU, C Gender-Specific Neuroimmunoendocrine Response to Treadmill Exercise in 3xTg-AD Mice. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2010, p. 128354, 2010.

GIUNTA, B; FERNANDEZ, F; NIKOLIC, W V; OBREGON, D; RRAPO, E; TOWN, T; TAN, J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 51, 2008.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 120, n. 3, p. 885-890, 1984a.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 122, n. 3, p. 1131-1135, 1984b.

GODBOUT, J. P.; CHEN, J.; ABRAHAM, J. *et al.* Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 10, p. 1329-1331, 2005.

GOMEZ RAVETTI, M.; MOSCATO, P. Identification of a 5-protein biomarker molecular signature for predicting Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3111, 2008.

GOMEZ-ISLA, T; HOLLISTER, R; WEST, H; MUI, S; GROWDON, J H; PETERSEN, R C; PARISI, J E; HYMAN, B T. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v. 41, n. 1, p. 17-24, 1997.

GOURAS, G. K.; ALMEIDA, C. G.; TAKAHASHI, R. H. Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 9, p. 1235-1244, 2005.

GREEN, K. N.; BILLINGS, L. M.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L.; LAFERLA, F. M. Glucocorticoids increase amyloid-beta and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 35, p. 9047-9056, 2006.

HAASS, C. Initiation and propagation of neurodegeneration. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1201-1204, 2010.

HALAGAPPA, V K; GUO, Z; PEARSON, M; MATSUOKA, Y; CUTLER, R G; LAFERLA, F M; MATTSON, M P. Intermittent fasting and caloric restriction

ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 1, p. 212-220, 2007.

HAMPEL, H; PRVULOVIC, D; TEIPEL, S; JESSEN, F; LUCKHAUS, C; FROLICH, L; RIEPE, M W; DODEL, R; LEYHE, T; BERTRAM, L; HOFFMANN, W; FALTRACO, F. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n. 4, p. 718-728, 2011.

HAN, W.; LI, C. Linking type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 107, n. 15, p. 6557-6558, 2010.

HARDY, J. Testing times for the "amyloid cascade hypothesis."**Neurobiol Aging**, v. 23, n. 6, p. 1073-1074, 2002.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184-185, 1992.

HARDY, J. A.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.

HARRISON, F. E.; REISERER, R. S.; TOMARKEN, A. J.; MCDONALD, M. P. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. **Learning & Memory**, v. 13, n. 6, p. 809-819, 2006.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience & Biobehavioral Review**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

HERRERA JR., E.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A. S.; NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 16, n. 2, p. 103-108, 2002.

HIRATA-FUKAE, C; LI, H F; HOE, H S; GRAY, A J; MINAMI, S S; HAMADA, K; NIIKURA, T; HUA, F; TSUKAGOSHI-NAGAI, H; HORIKOSHI-SAKURABA, Y; MUGHAL, M; REBECK, G W; LAFERLA, F M; MATTSON, M P; IWATA, N; SAIDO, T C; KLEIN, W L; DUFF, K E; AISEN, P S; MATSUOKA, Y. Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. **Brain Research**, v. 1216, p. 92-103, 2008.

HOLMES, C; BOCHE, D; WILKINSON, D; YADEGARFAR, G; HOPKINS, V; BAYER, A; JONES, R W; BULLOCK, R; LOVE, S; NEAL, J W; ZOTOVA, E; NICOLL, J A. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. **Lancet**, v. 372, n. 9634, p. 216-223, 2008.

IWATSUBO, T; ODAKA, A; SUZUKI, N; MIZUSAWA, H; NUKINA, N; IHARA, Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). **Neuron**, v. 13, n. 1, p. 45-53, 1994.

JANELSINS, M. C.; MASTRANGELO, M. A.; ODDO, S. *et al.* Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. **J Neuroinflammation**, v. 2, p. 23, 2005.

JANELSINS, M C; MASTRANGELO, M A; ODDO, S; LAFERLA, F M; FEDEROFF, H J; BOWERS, W J. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 6, p. 1768-1782, 2008.

JANUS, C.; WESTAWAY, D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 5, p. 873-886, 2001.

JI, J D; TASSIULAS, I; PARK-MIN, K H; AYDIN, A; MECKLENBRAUKER, I; TARAKHOVSKY, A; PRICOP, L; SALMON, J E; IVASHKIV, L B. Inhibition of interleukin 10 signaling after Fc receptor ligation and during rheumatoid arthritis. **J The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 11, p. 1573-1583, 2003.

JOHNSON, R. W. The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3-4, p. 443-450, 2002.

JUCKER, M. The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1210-1214, 2010.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; STROOPER, B. DE. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature Review Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 698-712, 2011.

KERN, A.; BEHL, C. The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 10, p. 1124-1132, 2009.

KINOSHITA, D.; COHN, D. W.; COSTA-PINTO, F. A.; SA-ROCHA, L. C. DE. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. **Physiology & Behavior**, v. 96, n. 2, p. 328-332, 2009.

KNIGHT, E. M.; VERKHRATSKY, A.; LUCKMAN, S. M.; ALLAN, S. M.; LAWRENCE, C. B. Hypermetabolism in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 1, p. 187-193, 2012.

LANDFIELD, P. W.; BLALOCK, E. M.; CHEN, K. C.; PORTER, N. M. A new glucocorticoid hypothesis of brain aging: implications for Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 2, p. 205-212, 2007.

LANG, A. E. Clinical trials of disease-modifying therapies for neurodegenerative diseases: the challenges and the future. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1223-1226, 2010.

LAU, K F; CHAN, W M; PERKINTON, M S; TUDOR, E L; CHANG, R C; CHAN, H Y; MCLOUGHLIN, D M; MILLER, C C. Dexras1 interacts with FE65 to regulate FE65-amyloid precursor protein-dependent transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 50, p. 34728-34737, 2008.

LEE, K S; CHUNG, J H; CHOI, T K; SUH, S Y; OH, B H; HONG, C H. Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 28, n. 4, p. 281-287, 2009.

LEE, Y. J.; HAN, S. B.; NAM, S. Y.; OH, K. W.; HONG, J. T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 33, n. 10, p. 1539-1556, 2010.

LEVY, E; CARMAN, M D; FERNANDEZ-MADRID, I J; POWER, M D; LIEBERBURG, I; VAN DUINEN, S G; BOTS, G T; LUYENDIJK, W; FRANGIONE, B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. **Science**, v. 248, n. 4959, p. 1124-1126, 1990.

LIND, K.; EDMAN, A.; NORDLUND, A.; OLSSON, T.; WALLIN, A. Increased saliva cortisol awakening response in patients with mild cognitive impairment. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 24, n. 5, p. 389-395, 2007.

LUCIN, K. M.; WYSS-CORAY, T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 110-122, 2009.

LYNCH, M. A.; MILLS, K. H. Immunology meets neuroscience--opportunities for immune intervention in neurodegenerative diseases. **Brain Behavior and Immunity**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2012.

MASTRANGELO, M. A.; BOWERS, W. J. Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. **BMC Neuroscience**, v. 9, p. 81, 2008.

MAYEUX, R. Genetic epidemiology of Alzheimer disease. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 20, n. 3 Suppl 2, p. S58-62, 2006.

MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats. **Physiology & Behavior**, v. 36, n. 4, p. 745-749, 1986.

MCKHANN, G M; KNOPMAN, D S; CHERTKOW, H; HYMAN, B T; JACK JR., C R; KAWAS, C H;; KLUNK, W E; KOROSHETZ, W J; MANLY, J J; MAYEUX, R; MOHS, R C; MORRIS, J C; ROSSOR, M N; SCHELTENS, P; CARRILLO, M C; THIES, B; WEINTRAUB, S; PHELPS, C H. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers & Dementia: The Journal of Alzheimer's Association**, v. 7, n. 3, p. 263-269, 2011.

MCKHANN, G; DRACHMAN, D; FOLSTEIN, M; KATZMAN, R; PRICE, D; STADLAN, E M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, v. 34, n. 7, p. 939-944, 1984.

MCNAULL, B. B.; TODD, S.; MCGUINNESS, B.; PASSMORE, A. P. Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's disease--a mini-review. **Gerontology**, v. 56, n. 1, p. 3-14, 2010.

MEJIA, S.; GIRALDO, M.; PINEDA, D.; ARDILA, A.; LOPERA, F. Nongenetic factors as modifiers of the age of onset of familial Alzheimer's disease. **International Psychogeriatric Association**, v. 15, n. 4, p. 337-349, 2003.

MEYER-LUEHMANN, M; SPIRES-JONES, T L; PRADA, C; GARCIA-ALLOZA, M; DE CALIGNON, A;; ROZKALNE, A; KOENIGSKNECHT-TALBOO, J; HOLTZMAN, D M; BACSKAI, B J; HYMAN, B T. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. **Nature**, v. 451, n. 7179, p. 720-724, 2008.

ODDO, S; CACCAMO, A; SHEPHERD, J D; MURPHY, M P; GOLDE, T E; KAYED, R; METHERATE, R; MATTSON, M P; AKBARI, Y; LAFERLA, F M. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. **Neuron**, v. 39, n. 3, p. 409-421, 2003.

ODDO, S.; CACCAMO, A.; SMITH, I. F.; GREEN, K. N.; LAFERLA, F. M. A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. **The American Journal ofPathology**, v. 168, n. 1, p. 184-194, 2006.

ODDO, S; CACCAMO, A; TRAN, L; LAMBERT, M P; GLABE, C G; KLEIN, W L; LAFERLA, F M. Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1599-1604, 2006.

OH, K J; PEREZ, S E; LAGALWAR, S; VANA, L; BINDER, L; MUFSON, E J. Staging of Alzheimer's pathology in triple transgenic mice: a light and electron microscopic analysis. **Int ernational Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2010, 2010.

PIEHL, F.; OLSSON, T. Inflammation and susceptibility to neurodegeneration: the use of unbiased genetics to decipher critical regulatory pathways. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1143-1150, 2009.

PIETROPAOLO, S.; FELDON, J.; YEE, B. K. Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 4, p. 733-747, 2008.

PRICE, J L; MCKEEL JR., D W; BUCKLES, V D; ROE, C M; XIONG, C; GRUNDMAN, M; HANSEN, L A; PETERSEN, R C; PARISI, J E; DICKSON, D W; SMITH, C D; DAVIS, D G; SCHMITT, F A; MARKESBERY, W R; KAYE, J; KURLAN, R; HULETTE, C; KURLAND, B F; HIGDON, R; KUKULL, W; MORRIS, J C.

Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 7, p. 1026-1036, 2009.

QUAN, N.; HERKENHAM, M. Connecting cytokines and brain: a review of current issues. **Histology and Histopathology**, v. 17, n. 1, p. 273-288, 2002.

RAY, S; BRITSCHGI, M; HERBERT, C;TAKEDA-UCHIMURA, Y; BOXER, A; BLENNOW, K; FRIEDMAN, L F; GALASKO, D R; JUTEL, M; KARYDAS, A; KAYE, J A; LESZEK, J; MILLER, B L; MINTHON, L; QUINN, J F.; RABINOVICI, G D; ROBINSON, W H; SABBAGH, M N; SO, Y T; SPARKS, D L; TABATON, M; TINKLENBERG, J; YESAVAGE, J A; TIBSHIRANI, R; WYSS-CORAY, T. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. **Nature Medicine**, v. 13, n. 11, p. 1359-1362, 2007.

REIMAN, E M; MCKHANN, G M; ALBERT, M S; SPERLING, R A; PETERSEN, R C; BLACKER, D. Alzheimer's disease: implications of the updated diagnostic and research criteria. **J Clin Psychiatry**, v. 72, n. 9, p. 1190-1196, 2011.

REISERER, R. S.; HARRISON, F. E.; SYVERUD, D. C.; MCDONALD, M. P. Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 1, p. 54-65, 2007.

REMARQUE, E J; BOLLEN, E L; WEVERLING-RIJNSBURGER, A W; LATERVEER, J C; BLAUW, G J; WESTENDORP, R G. Patients with Alzheimer's disease display a pro-inflammatory phenotype. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 1, p. 171-176, 2001.

RICHARTZ, E; STRANSKY, E; BATRA, A; SIMON, P; LEWCZUK, P; BUCHKREMER, G; BARTELS, M; SCHOTT, K. Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? **Journal of Psychiatric Research**, v. 39, n. 5, p. 535-543, 2005.

RICHWINE, A. F.; SPARKMAN, N. L.; DILGER, R. N.; BUCHANAN, J. B.; JOHNSON, R. W. Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. **Brain Behavior and Immunity**, v. 23, n. 6, p. 794-802, 2009.

RINGHEIM, G. E.; CONANT, K. Neurodegenerative disease and the neuroimmune axis (Alzheimer's and Parkinson's disease, and viral infections). **Journal of Neuroimmunology**, v. 147, n. 1-2, p. 43-49, 2004.

RIVEST, S. Regulation of innate immune responses in the brain. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 429-439, 2009.

ROBAKIS, N K; WISNIEWSKI, H M; JENKINS, E C; DEVINE-GAGE, E A; HOUCK, G E; YAO, X L. Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. **Lancet**, v. 1, n. 8529, p. 384-385, 1987.
ROHER, A E; ESH, C L; KOKJOHN, T A; CASTANO, E M; VAN VICKLE, G D; KALBACK, W M; PATTON, R L; LUEHRS, D C; DAUGS, I D; KUO, Y M;

EMMERLING, M R; SOARES, H; QUINN, J F; KAYE, J; CONNOR, D J; SILVERBERG, N B; ADLER, C H; SEWARD, J D; BEACH, T G; SABBAGH, M N. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. **Alzheimers & Dementia: The Journal of Alzheimer's Association**, v. 5, n. 1, p. 18-29, 2009.

ROSSOL, M; HEINE, H; MEUSCH, U; QUANDT, D; KLEIN, C; SWEET, M J; HAUSCHILDT, S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011.

ROY, S.; ZHANG, B.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q. Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. **Acta Neuropathologica**, v. 109, n. 1, p. 5-13, 2005.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. **Endocrine Review**, v. 7, n. 3, p. 284-301, 1986.

SAVVA, G M; WHARTON, S B; INCE, P G; FORSTER, G; MATTHEWS, F E; BRAYNE, C. Age, neuropathology, and dementia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 22, p. 2302-2309, 2009.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

SELKOE, D. J. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 447-453, 1998.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001a.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 789-791, 2002.

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sciences**, v. 87, n. 17-18, p. 521-536, 2010.

SPARKMAN, N L; BUCHANAN, J B; HEYEN, J R; CHEN, J; BEVERLY, J L; JOHNSON, R W. Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 42, p. 10709-10716, 2006.

SPULBER, S.; SCHULTZBERG, M. Connection between inflammatory processes and transmittor function-Modulatory effects of interleukin-1. **Progress in Neurobiology**, v. 90, n. 2, p. 256-262, 2010.

ST GEORGE-HYSLOP, P H; HAINES, J L; FARRER, L A; POLINSKY, R; VAN BROECKHOVEN, C; GOATE, A; MCLACHLAN, D R; ORR, H; BRUNI, A C; SORBI,

S; RAINERO, I; FONCIN, J F; POLLEN, D; CANTU, J M; TUPLER, R; VOSKRESENSKAYA, N; MAYEUX, R; GROWDEN, J; FRIED, V A; MYERS, R H; NEE, L; BACKHOVENS, H; MARTIN, J J; ROSSOR, M; OWEN, M J; MULLAN, M; PERCY, M E; KARLINSKY, H; RICH, S; HESTON, L; MONTESI, M; MORTILLA, M; NACMIAS, N; GUSELLA, J F; HARDY, J A. Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder. **Nature**, v. 347, n. 6289, p. 194-197, 1990.

STERNICZUK, R.; ANTLE, M. C.; LAFERLA, F. M.; DYCK, R. H. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. **Brain Research**, v. 1348, p. 149-155, 2010.

SUBRAMANIAN, S; AYALA, P; WADSWORTH, T L; HARRIS, C J; VANDENBARK, A A; QUINN, J F; OFFNER, H. CCR6: a biomarker for Alzheimer's-like disease in a triple transgenic mouse model. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 22, n. 2, p. 619-629, 2010.

SZELENYI, J. Cytokines and the central nervous system. **Brain Research Bulletins**, v. 54, n. 4, p. 329-338, 2001.

TUKEL, C; WILSON, R P; NISHIMORI, J H; PEZESHKI, M; CHROMY, B A; BAUMLER, A J. Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 1, p. 45-53, 2009.

UMEGAKI H, IKARI H, NAKAHATA H, ENDO H, SUZUKI Y, OGAWA O, NAKAMURA A, YAMAMOTO T, IGUCHI A. Plasma cortisol levels in elderly female subjects with Alzheimer's disease: a cross-sectional and longitudinal study. **Brain Research**, v. 881, n. 2, p. 241-243, 2000.

VEHMAS, A. K.; KAWAS, C. H.; STEWART, W. F.; TRONCOSO, J. C. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 321-331, 2003.

VIDONI, E. D.; TOWNLEY, R. A.; HONEA, R. A.; BURNS, J. M. Alzheimer disease biomarkers are associated with body mass index. **Neurology**, v. 77, n. 21, p. 1913-1920, 2011.

VINGTDEUX, V.; MARAMBAUD, P. Identification and biology of alpha-secretase. **J Journal of Neurochemistry**, v. 120 Suppl , p. 34-45, 2012.

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

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E. Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. **Life Sciences**, v. 57, n. 11, p. 1011-1026, 1995.

WEGIEL, J; WANG, K C; IMAKI, H; RUBENSTEIN, R; WRONSKA, A; OSUCHOWSKI, M; LIPINSKI, W J; WALKER, L C; LEVINE, H. The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice. **Neurobiology of Aging**, v. 22, n. 1, p. 49-61, 2001.

WINTON, M J; LEE, E B; SUN, E; WONG, M M; LEIGHT, S; ZHANG, B; TROJANOWSKI, J Q; LEE, V M. Intraneuronal APP, not free Abeta peptides in 3xTg-AD mice: implications for tau versus Abeta-mediated Alzheimer neurodegeneration. **J Neuroscience**, v. 31, n. 21, p. 7691-7699, 2011.

WIPPOLD 2ND, F. J.; CAIRNS, N.; VO, K.; HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J. C. Neuropathology for the neuroradiologist: plaques and tangles. **AJNR American Journal of Neuroradiology**, v. 29, n. 1, p. 18-22, 2008.

XUE, S. R.; XU, D. H.; YANG, X. X.; DONG, W. L. Alterations in lymphocyte subset patterns and co-stimulatory molecules in patients with Alzheimer disease. **Chinese Medical Journal (Engl)**, v. 122, n. 12, p. 1469-1472, 2009.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 21-22, p. 1570-1579, 2010.

ZISMAN, D A; KUNKEL, S L; STRIETER, R M; TSAI, W C; BUCKNELL, K; WILKOWSKI, J; STANDIFORD, T J. MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 12, p. 2832-2836, 1997.

ZLOKOVIC, B. V.; DEANE, R.; SAGARE, A. P.; BELL, R. D.; WINKLER, E. A. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 5, p. 1077-1089, 2010.