**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Egidi Mayara Firmino Silva

**Efeitos neuroprotetores do antagonismo dos receptores TRPV1 em um
modelo animal da Doença de Alzheimer**

Ribeirão Preto

2019

Egidi Mayara Firmino Silva

**Efeitos neuroprotetores do antagonismo dos receptores TRPV1 em um
modelo animal da Doença de Alzheimer**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Leonardo Resstel Barbosa
Moraes

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Ficha Catalográfica

Firmino, Egidi Mayara Silva

Efeitos neuroprotetores do antagonismo dos receptores TRPV1 em um modelo animal da Doença de Alzheimer – Ribeirão Preto, 2019

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

109f.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; receptores TRPV1; Memória;

SB366791

FOLHA DE APROVAÇÃO

Firmino, Egidi Mayara Silva

Efeitos neuroprotetores do antagonismo dos receptores TRPV1 em um modelo animal da Doença de Alzheimer

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Examinador 1: Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Examinador 2: Felipe Villela Gomes

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Examinador 3: Carolina Demarchi Munhoz

Instituição: USP-SP

Assinatura: _____

Examinador 4: Leandro José Bertoglio

Instituição: UFSC

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*“Assim como as estações, a vida tem ciclos. Os melhores dias são como memórias antigas de um verão regado de risadas, de aventuras e de calor. Mas depois do verão vem o outono. As folhas caem, as circunstâncias mudam. E o inverno é tão traiçoeiro que é quase impossível notar quando de fato começa e quando termina. As estações nos dão a oportunidade de redescobrimos o significado do que é paciência. Nos levam à reflexão, à esperança de uma nova primavera. No outono, no inverno, esperamos a primavera chegar. E assim como as estações, **A VIDA!**”*

Os arrais

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por todo amor, carinho e paciência.

Ao meu irmão pela parceria de vida.

Aos meus avós por todos os ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus que é essencial em minha vida, é a base que eu tenho para me guiar, iluminar e me fortalecer em todo o meu caminho sem perder a fé.

Aos meus familiares, por todo apoio, incentivo e força em todos os momentos dessa jornada.

Ao Prof. Leonardo Resstel, meu agradecimento por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender e evoluir cientificamente. Obrigada pela confiança e todos os ensinamentos. Aprendi muito durante esses anos.

Aos professores da banca examinadora: Dr. Leandro Bertoglio e Dra. Carolina Demarchi e Dr. Felipe Gomes pela atenção e disponibilidade concebida para participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos Prof. Morgan e Francisco Guimarães por abrirem as portas dos seus laboratórios e pela imensa contribuição na minha formação.

Aos amigos de laboratório, Anna Bárbara, Cassiano, Andreza, Jéssica, Luana, Dani, por todos os ensinamentos. Vocês tornaram meus dias mais felizes, foi muito bom receber o carinho de vocês.

Ao Davi Lagatta, minha eterna gratidão. Muito obrigada pelos ensinamentos, contribuição, paciência, incentivo, amizade, conselhos e por me permitir viver esse trabalho. Tudo isso foi além do laboratório. Você foi fundamental para a realização desse trabalho. Muito obrigada.

A Daniela Lescano, obrigada pelo incentivo desde o início até o final dessa jornada. Você me ajudou a crescer e evoluir. Gratidão.

A Fernanda, Karol, Ayda e Lais por dividir a vida comigo durante esse período. Obrigada por todas conversas, paciências e desabafos. Vocês tornaram a minha vida mais leve e feliz.

Aos amigos do Laboratório do Prof. Guimarães, Nicole, Alice, Naielly, Isa, por todos os momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do laboratório do Prof. Dr. Fernando Morgan: Ivaldo, Taiz e Maysa, obrigado pelo prazer da amizade de vocês.

Aos colaboradores desse trabalho, Flávio, Glaucia, Raquel, Sara e ao grupo do professor Sebolella, muito obrigada.

Aos técnicos Laura e Orlando por todas as instruções, assistência técnica, paciência, amizade. A ajuda de vocês foi fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Waldik e Gislaine pela disposição em atender prontamente nossas questões burocráticas, pelos momentos de risada e pelas broncas quando necessário.

Com certeza conviver e compartilhar o dia a dia com todos vocês deixou o trabalho muito mais fácil e prazeroso. A todos muito obrigado.

RESUMO

Firmino, E.M.S. **Efeitos neuroprotetores do antagonismo dos receptores TRPV1 em um modelo animal da Doença de Alzheimer.** Tese de Doutorado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

O processo neurotóxico da doença de Alzheimer (DA) é causado pela deposição da proteína beta-amilóide em torno dos neurônios das áreas do sistema nervoso central, como o córtex pré-frontal medial (MPFC) e o hipocampo (Hpc). Esse acúmulo de proteínas leva à excitotoxicidade glutamatérgica, que por sua vez induz um aumento exagerado nas concentrações intracelulares de cálcio. O cálcio, nessas condições, está relacionado à ativação de vias neurotóxicas que culminam na morte celular. O cálcio pode permear a célula através de outros receptores, como os canais TRPV1, a fim de ativar essas vias. Foi demonstrado em estudos *in vitro* que esses receptores contribuem para o aumento da expressão de marcadores inflamatórios e oxidantes induzidos pela aplicação da proteína beta-amilóide na cultura de astrócitos corticais. Tais dados sugerem que esses receptores podem contribuir para o processo neurotóxico da DA. No entanto, a avaliação do papel dos receptores TRPV1 tem sido pouco estudada. Portanto, a hipótese do presente estudo é a de que os receptores TRPV1 presentes no CPFM e Hpc podem exercer um efeito neurotóxico e prejudicar processos de plasticidade sináptica durante a evolução da doença. Para induzir os sintomas e prejuízos cognitivos da DA, camundongos C57 com 7 semanas de idade foram microinjetados com A β Os (i.c.v.) após cirurgia estereotáxica. Posteriormente, 24 horas após a microinjeção de A β Os, os animais foram submetidos a um tratamento repetido durante 14 dias com um antagonista do receptor de TRPV1, SB366791 ou veículo (0,15 mg/kg, i.p.). Em seguida, 24 horas após o término do tratamento, foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos e aos modelos de condicionamento de medo sonoro ou contextual. Após os testes comportamentais, MPFC e Hpc foram dissecados para análise molecular. Os procedimentos experimentais foram realizados seguindo protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 034/2018. Inicialmente, a microinjeção do A β Os promoveu prejuízo na memória de curto prazo 24h após a injeção. O tratamento com SB366791 preveniu significativamente o prejuízo da memória de curto prazo e de longo prazo no teste de reconhecimento de objetos ocasionados pelo A β Os. Da mesma forma, no teste de medo condicionado ao contexto ou ao som, o tratamento repetido com o SB366791 foi capaz de impedir o prejuízo da consolidação da memória aversiva induzida pelo A β Os. Além disso, neste modelo da DA, os animais apresentaram aumento nas citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α tanto no CPFM quanto no Hpc que também foi prevenido pelo SB366791. Apesar das alterações inflamatórias, não houve diferença nas células positivas de Iba-1 e NeuN entre os grupos. Adicionalmente, animais knockout TRPV1 também preveniram todas as alterações

comportamentais e moleculares ocasionadas pela microinjeção de A β Os. Experimentos prévios em cultura de tecido de humano também demonstraram que o A β Os parece promover um aumento na liberação de TNF α que é diminuída com o tratamento com SB366791. Estes resultados sugerem que o antagonismo do receptor TRPV1 tem um efeito neuroprotetor, diminuindo o déficit cognitivo no modelo de DA induzido por A β Os. Além disso, diminuiu as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α em MPFC e Hpc. Assim, a manipulação farmacológica dos receptores TRPV1 poderia oferecer uma nova abordagem para o tratamento da DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; receptores TRPV1; memória; SB366791

ABSTRACT

Firmino, E.M.S. **Neuroprotective effects of TRPV1 receptor antagonism in an animal model of Alzheimer's disease.** Thesis (Doctorate) – Department of Pharmacology. Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

The neurotoxic process of Alzheimer's disease (AD) is caused by the deposition of beta-amyloid protein around neurons of central nervous system areas such as the medial prefrontal cortex (MPFC) and hippocampus (Hpc). This protein accumulation leads to glutamatergic excitotoxicity, which in turn induces an exaggerated increase in the intracellular concentrations of calcium. Calcium, in these conditions, is related to the activation of neurotoxic pathways that culminate in cell death. Calcium can permeate the cell through other receptors such as TRPV1 channels in order to activate such pathways. It has been demonstrated in *in vitro* studies that these receptors contribute to increased expression of inflammatory and oxidant markers induced by application of beta-amyloid protein in cortical astrocyte culture. Such data suggest that these receptors may contribute to the neurotoxic process during disease development. However, the effect of a TRPV1 antagonist in an animal model of Alzheimer's disease has not yet been verified. Therefore, the hypothesis of the present project is that the TRPV1 receptors present in MPFC and Hpc can exert a neurotoxic effect and impair synaptic plasticity processes during the evolution of the disease. Methods: To induce AD-like pathological and cognitive impairments, C57 mice at 7 weeks of age were microinjected with A β Os (i.c.v.) after stereotaxic surgery. Subsequently, 24 hours after A β Os microinjection the animals underwent a 14 days repeated treatment with a TRPV1 receptor antagonist, SB366791 or vehicle (0.15mg / kg, i.p). Then, 24 hours after the end of the treatment, they were submitted to the object recognition test and to sound or contextual fear conditioning models. After the behavioral tests, MPFC and Hpc were dissected for molecular analysis. The experimental procedures were carried out following protocols approved by the Ethical Review Committee of the School of Medicine of Ribeirão Preto 034/2018. Initially, microinjection of A β Os impaired short-term memory 24 hours after injection. Treatment with SB366791 significantly prevented short-term and long-term memory impairment in the object recognition test. Similarly, in the context- or sound-conditioned fear test, repeated treatment with SB366791 was able to preclude A β Os induced damage of aversive memory consolidation. However, in the sound-conditioned fear test, animals with A β Os presented a greater expression of conditioned fear when compared to the control group. In addition, in this model the animals showed an increase in the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF α both in cortex and in hippocampus which has also been prevented by repeated TRPV1 receptor antagonism. Despite the inflammatory changes, there was no difference in positive Iba-1 and NeuN cells between the groups. In addition, TRPV1 knockout animals also prevented all behavioral and molecular changes caused by microinjection of A β Os. Previous experiments in human tissue culture have also shown that A β Os

appear to promote an increase in TNF α release that is decreased with treatment with SB366791. Our findings suggest that TRPV1 receptor antagonism has a neuroprotective effect by decreasing cognitive deficit in the A β O $_s$. induced AD model. In addition, it decreased proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF α in MPFC and Hpc. Thus, the pharmacological manipulation of TRPV1 receptors could offer a new approach for the treatment of AD.

Keywords: Alzheimer's disease; TRPV1 receptors; memory; SB369971

LISTA DE ABREVIACES

LISTA DE ABREVIATÓES

AEA – Anandamida

ANOVA – Análise de variância

APOE – Apolipoproteína E

A β Os – Oligômero de beta-amilóide

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA – soro albumina bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

CB1 – Receptor canabinóide do tipo 1

CPFM – Córtex pré-frontal medial

DA – Doença de Alzheimer

DMSO – Dimetilsulfóxido

dB – Decibéis

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

Hpc – Hipocampo

i.c.v – intracerebroventricular

i.p – Intraperitoneal

LTP – Potencial de longa duração

mA – Milliampere

MCS – Medo Condicionado ao som

MMC – Medo condicionado ao contexto

NAPDH – Enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – Óxido nítrico

PBS – Solução tampão fosfato salina

PFA – Paraformaldeído

PPA – Proteína precursora amilóide

PS1 – Presenilina 1

PS2 – Presenilina 2

T1 – Sessão de aquisição no teste reconhecimento de objeto

T2 – Sessão de retenção no teste de reconhecimento de objeto

TBS – salina tamponada com tris (do inglês *tris buffered saline*)

TBST – TBS e Tween 20

TLO – Teste de localização de objeto

TRO – Teste de reconhecimento de objeto

TRPV1 – Receptor vanilóide de potencial transiente do tipo 1

Vei – Veículo

βA – beta-amilóide

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do protocolo experimental do teste de reconhecimento de objeto (TRO) de 1 hora ou 24 horas

Figura 2: Esquema representativo do protocolo experimental do teste de localização de objeto (TLO) de 24 horas

Figura 3: Esquema representativo do protocolo do medo condicionado ao contexto

Figura 4: Esquema representativo do protocolo do medo condicionado ao contexto

Figura 5: A β Os promove prejuízo após 24 horas na memória de curto prazo (1h) no teste de reconhecimento de objeto em camundongos com A β Os

Figura 6: Única injeção de SB366791 (i.p) não apresenta efeito na recuperação da memória de curto prazo (1h) no teste de reconhecimento de objeto em camundongos com A β Os

Figura 7: Tratamento com SB366791 (i.p) resgata prejuízo da memória de curto prazo (1h) e longo prazo (24h) no teste reconhecimento de objeto em camundongos com A β Os

Figura 8: Tratamento com SB366791 (i.p) resgata prejuízo da memória espacial em camundongos com A β Os

Figura 9: Tratamento com SB366791 (i.p) resgata prejuízo da memória de consolidação da extinção no modelo de medo condicionado ao contexto em camundongos com A β Os

Figura 10: Tratamento com SB366791(i.p) resgata prejuízo da memória de consolidação da extinção no modelo de medo condicionado ao som em camundongos com A β Os

Figura 11: Tratamento com SB366791 (i.p) diminui a expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α em regiões do cérebro em camundongos com A β Os

Figura 12: Tratamento com SB366791(i.p) não apresenta efeito na dosagem de óxido nítrico nas regiões do córtex e hipocampo em camundongos com A β Os

Figura 13: Efeito da injeção de A β Os (i.c.v) e do tratamento com SB366791 (i.p) sobre a quantidade de células positivas de NeuN e Iba-1 no córtex pré-frontal de animais com A β Os

Figura 14: Dosagem de A β Os no hipocampo nos períodos de 4 horas, 24 horas, e 48 horas após a microinjeção de A β Os (i.c.v) em camundongos.

Figura 15: Animais knockout TRPV1 não apresentam prejuízo da memória de curto ou longo prazo em camundongos com A β Os

Figura 16: Animais knockout TRPV1 não apresentam prejuízo na consolidação da memória de extinção no medo condicionado ao som

Figura 17: Animais knockout TRPV1 apresentam uma diminuição na expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α em regiões do cérebro em camundongos com A β Os

Figura 18. Efeito da microinjeção de A β Os (i.c.v) na quantidade de células positivas para NeuN em animais knockout

Figura 19: Expressão de TNF- α em culturas de fatias do córtex de cérebro humano adulto

Figura 20. Efeitos da incubação com A β Os e SB366791 na quantidade de células positivas NeuN em fatias de cérebro humano

Figura 21. Fotomicrografias representativas da expressão dos receptores TRPV1 em fatias de cérebro humano

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
2. HIPÓTESE DO ESTUDO.....	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 Animais.....	44
4.2 Preparação de oligômeros do peptídeo β -amilóide.....	44
4.2.1 Preparação de filmes de peptídeo β -amilóide	44
4.2.2 Ressuspensão dos filmes de peptídeo β -amilóide.....	45
4.3 Injeção intracerebroventricular de oligômeros β -amilóide.....	45
4.4 Tratamento farmacológico.....	45
4.5 Testes comportamentais	46
4.5.1 Teste de reconhecimento de objeto (TRO)	47
4.5.2 Teste de localização do objeto (TLO)	48
4.5.3 Medo condicionamento ao contexto (MCC)	50
4.5.4 Medo condicionamento ao som (MCS).....	51
4.6 ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay).....	52
4.7 Western Blotting.....	53
4.8 Determinação de nitrito e nitrato (NOx).....	54
4.9 Cultura de fatias humanas adultas.....	54
4.10 Imunofluorescência e microscopia confocal.....	56
4.11 Análise estatística.....	57
5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	57
5.1 Efeito da microinjeção do A β Os ou veículo intracerebroventricular após 24 horas sobre a memória de reconhecimento de objetos.	57
5.2 Efeito de uma única injeção do SB366791 sobre a memória de reconhecimento de objetos (TRO) em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.	58
5.3 Efeitos do tratamento repetido com SB366791 sobre a memória de reconhecimento de objetos (TRO) em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.	58
5.4 Efeitos do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 sobre a memória de localização (TLO) em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.	59
5.5 Efeitos do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 sobre a extinção de memória aversiva associada ao contexto em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.....	59

5.6 Efeitos do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 sobre a extinção de memória aversiva associada ao som em camundongos que receberam AβOs ou veículo por injeção intracerebroventricular.....	60
5.7 Participação dos receptores TRPV1 sobre a memória de reconhecimento de objetos (TRO) em camundongos que receberam AβOs por injeção intracerebroventricular.....	60
5.8 Participação dos receptores TRPV1 sobre a memória aversiva do condicionamento ao som (MCS) em camundongos que receberam AβOs ou por injeção intracerebroventricular.	61
6. RESULTADOS	62
6.1 Efeito da microinjeção de AβOs ou veículo intracerebroventricular após 24 horas sobre a memória de reconhecimento de objetos.	63
6.2 Uma única injeção do SB366791 não apresenta efeito sobre a memória de reconhecimento de objetos em camundongos que receberam AβOs ou veículo por injeção intracerebroventricular.	64
6.3 Tratamento crônico com SB366791 resgata prejuízo da memória de curto ou longo prazo em camundongos que receberam AβOs ou veículo por injeção intracerebroventricular.....	65
6.4 Tratamento crônico com SB366791 resgata prejuízo da memória de localização em camundongos que receberam AβOs ou veículo por injeção intracerebroventricular	66
6.5 Tratamento crônico com SB366791 recupera prejuízo de memória no medo condicionado ao contexto em camundongos que receberam AβOs ou veículo por injeção intracerebroventricular	67
6.6 Tratamento crônico com SB366791 resgata prejuízo da memória no medo condicionado ao som em camundongos que receberam AβOs ou veículo por injeção intracerebroventricular.....	69
6.7 Administração intracerebroventricular de AβOs induz inflamação em regiões do cérebro como CPFM e Hpc e o tratamento com SB366791 diminui a expressão das citocinas envolvidas nesses processos neurotóxicos e inflamatórios, como TNF-α, IL-1β	70
6.8 Injeção de AβOs e tratamento com SB366791 não apresenta efeito sobre o nível de substâncias oxidantes, como os metabólitos do óxido nítrico (NOx) no córtex e hipocampo de camundongos que receberam AβOs	72
6.9 Injeção de AβOs e tratamento com SB366791 não apresenta efeito sobre o número de células NeuN+ e Iba-1+ no córtex e hipocampo de camundongos que receberam AβOs.	72
6.10 Dosagem de AβOs no hipocampo nas primeiras horas após a administração intracerebroventricular.	75
6.11 Animais knockout TRPV1 não apresentam prejuízo da memória de curto ou longo prazo em camundongos que receberam AβOs por injeção intracerebroventricular .	76
6.12 Animais knockout TRPV1 não apresentam prejuízo da memória no medo condicionado ao som (MCD) em camundongos com DA receberam AβOs por injeção intracerebroventricular	77

6.13 Animais knockout TRPV1 apresentam um aumento na expressão das citocinas envolvidas nos processos inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β	78
6.14 Efeito da microinjeção de A β Os na quantidade de células positivas para NeuN	80
6.15 Incubação com A β Os parece promover um aumento da citocina inflamatória TNF- α em fatias de cérebro humano	82
6.16 Incubação com A β Os interfere na quantidade de células positivas de NeuN em fatias de cérebro humano	83
6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÃO.....	96
8. REFERÊNCIAS	98
ANEXOS	109

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurológica progressiva, caracterizada por perda sináptica, neurodegeneração, perda da memória e comprometimento nas habilidades cognitivas (Bedse et al., 2014c; Brkic et al., 2015; Chen et al., 2017; Faucher et al., 2016; Liu et al., 2019; Rudy et al., 2015a).

Os primeiros relatos da doença de Alzheimer (DA) surgiram no ano de 1901 através das observações do psiquiatra clínico Alois Alzheimer (Hippius and Neundörfer, 2003; Yang et al., 2016). Durante o seu exercício profissional no Hospital Psiquiátrico de Frankfurt, ele acompanhou o caso de dois pacientes que apresentavam problemas cognitivos severos muito semelhantes à demência senil, uma condição já conhecida nesta época. Entretanto, a idade precoce com que eles apresentavam estas alterações gerou controvérsia a respeito do diagnóstico, concluindo-se, a partir de várias discussões, que eles apresentavam uma “demência pré-senil”. Com a morte de ambos os pacientes ao longo da primeira década do século XX foram realizadas análises anatômicas e histológicas, levando à observação da presença de “feixes de fibras” e pequenas “manchas” que estavam espalhadas por todo o córtex cerebral, além da atrofia cortical (Yang et al., 2016).

Estes relatos foram publicados em 1911 em um periódico científico de um dos colaboradores do Dr. Alois Alzheimer. Entretanto, devido à subnotificação e/ou raridade dos casos da referida “demência pré-senil”, apenas na década de 1960 esses achados neurobiológicos foram confirmados através de extensos estudos histopatológicos e epidemiológicos do grupo do pesquisador Robert Katzman, membro da Universidade da Califórnia, denominando definitivamente

esta patologia como “Doença de Alzheimer”, em referência ao médico alemão (Hippius and Neundörfer, 2003).

Atualmente a DA é a doença neurodegenerativa mais prevalente em todo o mundo, além de ser a forma mais comum de demência, sendo causa de aproximadamente 75% dos casos de demência, sozinha ou combinada a outras doenças (Alzheimer’s Association, 2014; Andrew E. Budson and Paul R. Solomon, 2017). No ano de 2015, aproximadamente 46,8 milhões de pessoas no mundo estavam vivendo com demência e acreditava-se que esse número chegaria perto de 50 milhões no ano de 2017 (Alzheimer Disease International, 2015). Em 2019, estima que existam mais de 50 milhões pessoas vivendo com demência globalmente e esse número pode chegar a 152 milhões em 2050 (Alzheimer’s Disease International, 2019). O custo da demência é estimado em 1 trilhão de dólares, e esse valor pode dobrar até o ano de 2030. Neste sentido, um maior entendimento desta condição, bem como a procura por novos alvos terapêuticos são necessários para reduzir a sua incidência e prevalência.

A patogênese da doença envolve alterações nos processos de clivagem e na expressão da proteína precursora amiloide (PPA), que é uma proteína integral de membrana presente nos neurônios do sistema nervoso central (Hippius and Neundörfer, 2003). Uma das vias de clivagem da PPA é regulada pela enzima β -secretase, que leva à produção de uma proteína de cadeia mais curta, chamada β -amilóide (β A) que é liberada na sua forma monomérica, constituindo a via amiloidogênica. A outra via é chamada de não-amiloidogênica visto que a quebra da PPA resulta na produção de um segmento proteico semelhante, porém diferente da β A verdadeira, sendo regulada pela enzima α -secretase (Honjo et al., 2012). Adicionalmente, a atividade destas duas vias é

também controlada pelas enzimas γ -secretases, que possuem como cofatores as presenilinas que são codificadas pelos genes PS1 e PS2 (De Strooper et al., 1998). Em condições normais, estas duas vias de clivagem permanecem em equilíbrio, de modo que são produzidas quantidades moderadas da β A, que possui papéis importantes na mediação de processos de facilitação da transmissão sináptica e plasticidade (Abramov et al., 2009). Entretanto, devido à existência de polimorfismos nos genes que regulam a expressão a PPA (gene APP – *amyloid precursor protein*), assim como nos loci das enzimas secretases e das presenilinas, ocorre um aumento no nível de expressão da PPA, acompanhado por uma facilitação da via amiloidogênica, levando a uma maior produção de monômeros da β A. Nestas condições, estes monômeros tendem a se agregar, formando oligômeros da β A que se depositam ao redor das sinapses neurais, levando a um processo de desagregação das sinapses (Palop and Mucke, 2010).

Clinicamente, a DA é dividida em DA familiar (DAF) e DA esporádica (DAE). A DAF é responsável por 1 a 5% de todos os casos da DA e são o resultado de mutações em três genes, tais como, PPA, PS1 e PS2 (Canter et al., 2016; Reitz and Mayeux, 2014). Como citado anteriormente, essas mutações na PPA, PS1 e PS2 deslocam o processamento da PPA para a via amiloidogênica e desviam a clivagem da PPA em direção aos peptídeos β -amilóide-tóxicos (Canter et al., 2016). Por outro lado, a DAE corresponde a 95% de todos os casos de DA (Liu et al., 2019). Entre os fatores de risco que podem contribuir para a suscetibilidade de um indivíduo a desenvolver a DA de forma esporádica está a mutação na variante genética (alelo) chamado de ApoE4, alelo responsável por codificar a apolipoproteína E (ApoE)(Corder et al., 1993; Reitz

and Mayeux, 2014). O ApoE4 é o maior fator de risco genético conhecido para a DA (Canter et al., 2016; Corder et al., 1993; Reitz and Mayeux, 2014; Strittmatter et al., 1993), sua presença leva a um aumento de três ou quatro vezes na probabilidade de desenvolver DA (Corder et al., 1993). Consequentemente, as pessoas com DA portadoras de ApoE4 mostram mais evidência de agregados e deposição de β A do que os não portadores com DA, promovendo desta forma uma neurotoxicidade (Morris et al., 2010).

A neurotoxicidade decorrente da deposição da β A acomete determinadas áreas do sistema nervoso central, como o córtex pré-frontal medial (CFPM) e o hipocampo (Hpc) (Busche et al., 2012; Jin et al., 2011). Nestas estruturas acontecem processos neuroplásticos dependentes da atividade dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA localizados na sinapse (S-NMDA). A entrada de íons cálcio através desse receptor desencadeia a ativação de diversas cascatas de sinalização intracelulares, como a via de fosforilação do elemento de resposta à ligação ao AMPc (CREB- *cAMP response element binding protein*), um fator de transcrição essencial na síntese e liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *brain derived neurotrophic factor*) (Acheson et al., 1995; Deogracias et al., 2004). O BDNF é uma neurotrofina responsável pela ativação do receptor TrkB, que sofre uma fosforilação e leva a uma sequência de eventos celulares, promovendo efeitos neuroprotetores por aumentar o número de conexões entre os neurônios e a formação espinhas dendríticas (Deogracias et al., 2004; Leal et al., 2014). A mediação de tais fenômenos neuroplásticos pela via S-NMDA/CREB/BDNF-TrkB no CPFM e Hpc está envolvida em processos de formação de memória (Brightwell et al., 2004; Canto-de-Souza and Mattioli, 2016; Giustino and Maren, 2015; Impey et al.,

1998; Martínez et al., 2014; Zoladz et al., 2012). Além disso, esta mesma via também facilita a potenciação de longo prazo (LTP- *long term potentiation*), um fenômeno celular subjacente à formação de memória (Bliss and Collingridge, 1993; Korte et al., 1998; Minichiello, 2009; Minichiello et al., 2002; Taylor et al., 2016).

Os processos mnemônicos decorrentes destes mecanismos celulares que podem ser modulados pelo CPFM e o Hpc incluem a memória de reconhecimento e a extinção de memórias aversivas (Maren, 2011; Martínez et al., 2014; Rosas-Vidal et al., 2014; Sahay et al., 2011). A memória de reconhecimento se caracteriza pela capacidade de identificar um objeto ou situação e julgá-los como novos ou não (Devan et al., 1996; Warburton and Brown, 2010). Já o processo de extinção refere-se à formação de uma nova memória, paralelamente à informação previamente adquirida (VanElzakker et al., 2014). Em animais, este processo pode ser avaliado pela associação entre um estímulo neutro (contexto ou som) e um estímulo aversivo (choque nas patas) (Maren, 2011). Entretanto, os eventos celulares mediados pelos receptores S-NMDA subjacentes a estes processos mnemônicos acontecem quando existe uma liberação de quantidades moderadas de glutamato (Palop et al., 2006). A liberação pré-sináptica e astrocitária de glutamato, bem como sua captação através de transportadores de aminoácidos presentes nos astrócitos, determinam a quantidade de glutamato extracelular e o tempo de sua permanência na fenda sináptica (Lehre et al., 1995; Rudy et al., 2015b). A deposição da β A modifica a cinética de liberação e captação do glutamato, uma vez que é capaz de ativar os receptores colinérgicos nicotínicos presentes na membrana pré-sináptica e nos astrócitos, aumentando a liberação neuronal e

astrocitária de glutamato (Brito-Moreira et al., 2011; Pirttimaki et al., 2013; Talantova et al., 2013). A β A também é capaz de inibir a captação de glutamato pelos astrócitos através de sua interação com as proteínas transportadoras de aminoácidos destas células (Matos et al., 2008; Parpura-Gill et al., 1997). Tais ações favorecem o acúmulo do neurotransmissor no espaço extracelular. Nestas condições, o glutamato se difunde até atingir os receptores glutamatérgicos NMDA localizados no espaço extrasináptico (E-NMDA) (Groc et al., 2009).

O cálcio que permeia a célula através dos E-NMDA induz efeitos antagônicos aos produzidos por receptores S-NMDA, visto que os primeiros inibem a ativação da via do CREB-BDNF, prejudicando os processos de plasticidade sináptica e sobrevivência neural (Hardingham et al., 2002). Os E-NMDA também estimulam a produção e liberação de fatores de apoptose, como a caspase-3, bem como substâncias oxidantes, como o ânion superóxido e óxido nítrico (Talentova et al., 2013). Rammes e colaboradores em 2011 demonstraram que a aplicação da β A em cortes de neurônios hipocámpais de camundongos causa prejuízo da LTP dependente da ativação de receptores NMDA, sugerindo um possível papel dos E-NMDA neste efeito (Rammes et al., 2011a). Além disso, os E-NMDA ativam determinadas enzimas, como a glicogênio sintase quinase (GSK), que contribuem para a hiperfosforilação da proteína tau, que nestas condições se destaca do citoesqueleto e forma os chamados “emaranhados neurofibrilares” no interior dos neurônios, contribuindo para disfunção sináptica e morte neural (Song et al., 2008).

A β A também produz efeitos na micróglia, estimulando a liberação de TNF- α e glutamato, que sinergisticamente facilitam a degeneração dos neurônios, sendo um efeito dependente da ativação da enzima óxido nítrico

sintase induzível (iNOS), que tem a expressão aumentada durante o processo inflamatório (Floden et al., 2005). Adicionalmente, a micróglia produz várias citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores imunológicos que criam um ambiente neurotóxico que leva à progressão da DA (Akiyama, 2000; Wyss-Coray, 2006). Vários estudos evidenciam um número aumentado de micróglia morfológicamente reativa em cérebros com DA comparada para indivíduos que não possuem a DA (Cras et al., 1990; Styren et al., 1990). Nos astrócitos, a β A aumenta a expressão do gene da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), responsável pela produção de prostaglandinas inflamatórias, bem como da enzima iNOS (Benito et al., 2012a), demonstrando a existência de um componente inflamatório associado à ação da β A nas células da glia.

Consequentemente, o efeito deletério da β A sobre os processos de plasticidade sináptica e sobrevivência neural, associados à morte acentuada de neurônios no CPFM e Hpc contribui para prejuízo da formação de memória espacial, de reconhecimento e a extinção de memória aversiva e é uma consequência direta da excitotoxicidade glutamatérgica (Bonardi et al., 2011; Kumar et al., 2015; Nicole et al., 2016; Sadigh-Eteghad et al., 2015; Vaucher et al., 2002). Neste contexto, foi demonstrado que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA pela memantina, um antagonista não competitivo destes receptores, atenuou a morte de neurônios em cultura induzida pela aplicação da β A (Floden et al., 2005). Clinicamente, a memantina retarda a progressão dos sintomas da doença e constitui uma das estratégias terapêuticas disponíveis clinicamente para tratar a doença (Reisberg et al., 2003). Portanto, a redução dos efeitos do glutamato previne o prejuízo da função cognitiva e facilita ativação

de vias neuroprotetoras e constitui uma das estratégias terapêuticas no tratamento da DA.

Interessantemente, a transmissão glutamatérgica nas áreas afetadas pela DA pode ser fisiologicamente modulada por outros neurotransmissores, como os endocanabinóides, que são neuromoduladores produzidos por demanda a partir do ácido araquidônico, presente na membrana plasmática (Auclair et al., 2000; Goonawardena et al., 2011; Piomelli, 2003). A entrada de cálcio pelos receptores NMDA, além de produzir efeitos plásticos, induz a produção da anandamida (AEA), um dos endocanabinóides mais bem caracterizados (Marsicano et al., 2003). A AEA é então liberada do neurônio pós-sináptico, ativando os receptores canabinóides do tipo 1 (CB₁) no neurônio pré-sináptico. Estes receptores estão acoplados a uma proteína G inibitória que reduz a entrada de cálcio na pré-sinapse e inibe dessa forma a liberação de glutamato (Rodríguez-Muñoz et al., 2016). Além disso, a expressão do RNAm do receptor CB₁ se encontra aumentada no CPFM e Hpc a partir do sexto mês de idade em camundongos transgênicos APP/PS1, nos quais foram inseridos os genes humanos que levam à deposição de β A (Bedse et al., 2014a).

Por terem a sua expressão aumentada em áreas afetadas pela β A na DA e por inibirem a liberação de glutamato nestas estruturas, a atividade dos receptores CB₁ poderiam exercer um efeito neuroprotetor na doença. Aso e colaboradores em 2012 testaram o efeito do tratamento repetido com um agonista destes receptores em camundongos APP/PS1. Esse agonista foi capaz de reduzir a expressão da proteína tau, além de diminuir a ativação astrocitária e a liberação de INF- γ ao redor das placas amiloides localizados no córtex cerebral, sugerindo um efeito neuroprotetor e anti-inflamatório. Adicionalmente,

o mesmo composto reduziu a morte de neurônios em cultura induzida pela aplicação da β A. Adicionalmente, o prejuízo da memória de reconhecimento observado nos animais transgênicos foi prevenido pelo tratamento com a droga. Não obstante, o tratamento melhorou a aquisição de memória aversiva, avaliada com o teste de esquiva ativa. Provavelmente, estes efeitos seriam uma consequência da redução da excitotoxicidade glutamatérgica, favorecida pela ativação dos receptores CB₁ pré-sinápticos e astrocitários (Aso et al., 2012a).

Por outro lado, foi demonstrado que a AEA é capaz de produzir efeitos no cérebro de camundongos knockout para receptores CB₁, sugerindo outros sítios de ação para esse composto. O receptor não-canabinóide mais bem caracterizado para a ação da AEA é o receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1 – *transient receptor potential vanilloid type 1*) (Zygmunt et al., 1999).

Os receptores TRPV1 são acoplados a canais iônicos não seletivos para cátions, porém mais permeáveis ao cálcio e facilitam a entrada deste íon nas células (Caterina et al., 1997a). Os receptores TRPV1 estão envolvidos na termogênese e na percepção da dor de estímulos nocivos, incluindo calor e ácido (Caterina et al., 1997b), esses receptores também apresentam um papel no desenvolvimento da dor neuropática e hiperalgesia (Davis et al., 2000). Eles foram primeiramente descritos em fibras C aferentes, que são neurônios nociceptivos, porém estão presentes em estruturas do sistema nervoso central, tais como córtex, hipocampo e cerebelo (Mezey et al., 2000; Tóth et al., 2005). Uma diminuição da função TRPV1 aumenta a expressão de genes associados com neurogênese e plasticidade sináptica (Wang et al., 2017).

Em nível sináptico foi demonstrado que, ao contrário dos receptores CB₁, os receptores TRPV1 do Hpc aumentam a liberação de glutamato, através do aumento da permeabilidade da membrana ao cálcio (Eguchi et al., 2016). Os receptores TRPV1 do cérebro parecem estar envolvidos na função cognitiva, visto que a injeção intracerebroventricular de um antagonista destes receptores prejudicou a discriminação de objetos em um teste de memória episódica (Bannazadeh et al., 2017). Devido a estes fatores, Yamamoto e colaboradores em 2007 sugeriram que os receptores TRPV1 poderiam estar envolvidos na facilitação da excitotoxicidade glutamatérgica que acontece na DA (Yamamoto et al., 2007). Adicionalmente a isso, diversos estudos demonstram que os receptores TRPV1 estão expressos na micróglia, nos astrócitos e neurônios e devido a isso eles podem ter um papel importante na DA (Doly, Fischer et al. 2004, Bari, Bonifacino et al. 2011). Huang e colaboradores (2015) demonstraram que a ausência do TRPV1 reduz o nível de citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, IL-6, TNF), enquanto a super expressão destes receptores aumenta as citocinas pró-inflamatórias e diminui citocinas anti-inflamatórias na micróglia (Huang, Yu et al. 2015). Adicionalmente, a ativação dos receptores TRPV1 medeia uma série de transformações que vão desde a liberação de mediadores inflamatórios (Huang, Yu et al. 2015) à morte celular microglial in vivo e in vitro (Kong, Wang et al. 2019). Levando em consideração que os receptores TRPV1 parecem estar envolvidos na função cognitiva, propomos que os receptores TRPV1 poderiam participar do efeito deletério sobre os processos de plasticidade sináptica e estimular a neurotoxicidade induzida pela β A.

2. HIPÓTESE DO ESTUDO

2. HIPÓTESE DO ESTUDO

Levando em consideração que os receptores TRPV1 parecem estar envolvidos na função cognitiva e inflamatória, a hipótese do presente estudo é que os receptores TRPV1 presente no córtex pré-frontal e no hipocampo facilitam o processo neurotóxico e contribuem para o prejuízo da plasticidade sináptica, da formação de memória e neuroinflamação induzidos pela injeção intracerebroventricular do oligômero de β A em camundongos.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos na microinjeção de A β Os e os possíveis efeitos neuroprotetores do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 em camundongos C57.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 - Mensurar o efeito do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 sobre a memória de reconhecimento de objetos em camundongos que receberam injeção intracerebroventricular de A β Os ou do respectivo veículo

3.2.2 - Avaliar o efeito do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 sobre a extinção de memória aversiva ao contexto ou ao som em camundongos, pela injeção intracerebroventricular desta proteína ou do respectivo veículo.

3.2.2 - Verificar o efeito do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 em camundongos sobre a expressão de proteínas e enzimas envolvidas em processos neurotóxicos e inflamatórios no CPFM e Hpc, como a β A, TNF- α , IL-1 β , bem como o nível de substâncias oxidantes, como os metabólitos do óxido nítrico (NOx) nas mesmas estruturas.

3.2.3 - Avaliar o efeito do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 em camundongos com A β Os sobre o nível de expressão de proteínas Iba-1 e NeuN no CPFM e Hpc.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57/Bl6 de 7 semanas de idade, provenientes do Serviço de Biotério da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas coletivas com 4 ou 5 animais por caixa, com livre acesso a água e alimento, em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas). Os procedimentos experimentais desenvolvidos nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob número de protocolo 034/2018 **(Anexo A)**.

4.2 Preparação de oligômeros do peptídeo β -amilóide

4.2.1 Preparação de filmes de peptídeo β -amilóide

Como descrito por Chromy et al., (2003), 1mg do peptídeo A β 1-42 humano (AnaSpec) foi ressuspenso em 500 μL de hexafluoroisopropanol (HFIP, Sigma) gelado. Sem homogeneizar, o frasco foi selado com parafilme e mantido em repouso por um período de 1 hora em temperatura ambiente. Após o repouso, foi realizada uma alíquota em oito tubos estéreis gelados em fluxo laminar. Posteriormente, esses tubos permaneceram abertos, no fluxo laminar, *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, os tubos foram cobertos com parafilme furado e submetidos a secagem completa em *speed vac* por um período de 10 minutos. Em seguida os tubos foram fechados, selados com parafilme em caixa contendo sílica dessecante no ultrafreezer a -80°C .

4.2.2 Ressuspensão dos filmes de peptídeo β -amilóide

Como descrito por Chromy et al., (2003), em fluxo laminar, um tubo de filme de A β foi ressuspendido em 5 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Após a ressuspensão, o conteúdo foi diluído em 245 μ L de PBS (Laborclin) estéril. Simultaneamente, em um tubo vazio e estéril, foi preparado o veículo com a diluição de 5 μ L de DMSO em 245 μ L do PBS estéril. Ambos os tubos foram misturados no vórtex por 10 segundos. Os dois tubos foram incubados por 2 horas a 4°C. NO dia seguinte, os tubos foram submetidos a centrifugação a 14000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo pré-gelado. A solução de A β Os foi quantificada pelo método de Bradford. O volume total foi aliquotado e mantido a 4°C para uso imediato ou congelado para uso posterior.

4.3 Injeção intracerebroventricular de oligômeros β -amilóide

Para injeção intracerebroventricular do A β Os, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,1 mL/10 gramas i.p., Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Os animais foram colocados num aparato de estereotaxia de uma cânula de aço inoxidável foi implantada no ventrículo esquerdo segundo as coordenadas descritas por Figueiredo, (2013) (Figueiredo et al., 2013). Os animais foram divididos em grupo A β Os e seu respectivo veículo (dimetilssulfóxido).

4.4 Tratamento farmacológico

Os animais foram tratados com antagonista seletivo de receptores TRPV1, SB366791 (Tocris®, St. Louis, EUA) ou veículo (DMSO 0,1% em salina)

(Nerandzic et al., 2017) por via intraperitoneal (i.p.), em um volume final de 10 mL/Kg, durante 14 dias. Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais: (1) Veículo (i.c.v)-veículo (i.p); (2) Veículo (i.c.v)-SB366791(i.p); (3) A β Os (i.c.v)-veículo (i.p) e (4) A β Os (i.c.v)-SB366791 (i.p). A dose de SB366791 foi baseada no trabalho de Ma e colaboradores (2016). Foi preparada uma solução estoque e as soluções para injeção foram preparadas no dia dos tratamentos. Foram utilizados em média 8 animais para cada grupo experimental para os protocolos com testes comportamentais.

4.5 Testes comportamentais

Foi realizado apenas um experimento agudo com o intuito de verificar se a droga tinha efeito apenas com uma única injeção. Posteriormente, com o intuito de minimizar a quantidade de animais de experimentação, os testes comportamentais tiveram início 24 horas após o último dia de tratamento, excluindo-se a necessidade de grupos experimentais com tratamento agudo. O esquema geral dos procedimentos se encontra no **Esquema 1 e 2**.

Esquema 1: Esquema representativo do protocolo experimental com uma única injeção de SB366791 (0,15mg/Kg; i.p) após a microinjeção do oligômero de β -amilóide (A β Os) intracerebroventricular. Teste comportamental: TRO (Teste de reconhecimento de objeto).

Esquema 2: Esquema representativo do protocolo experimental durante 14 dias de tratamento com SB366791 (0,15mg/Kg; i.p) após a microinjeção do oligômero de β -amilóide (A β O's) intracerebroventricular. Testes comportamentais: TRO (Teste de reconhecimento de objeto); MMC (Medo condicionado ao contexto); MCS (Medo condicionado ao som).

4.5.1 Teste de reconhecimento de objeto (TRO)

O TRO foi realizado em uma arena circular de acrílico (40 cm de diâmetro e altura de 40 cm). Um dia antes do experimento, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação a arena com duração de 10 minutos. No dia do experimento os animais foram colocados na arena contendo dois objetos idênticos por um período de 5 minutos (sessão de aquisição-T1). Posteriormente um dos objetos presentes na sessão de aquisição foi trocado por um objeto novo com tamanho, textura e cor diferentes dos objetos da primeira sessão. Os animais foram colocados na arena contendo o objeto novo e familiar por 5 minutos e o tempo de interação com cada objeto foi registrado (sessão de retenção-T2). O intervalo entre T1 e T2 foi de 1 hora ou 24 horas, para avaliação da retenção de memória de curto prazo ou longo prazo respectivamente. Os objetos possuem em média 16 cm de altura e tem peso suficiente para não serem deslocados pelos animais durante o experimento. Entre os animais, os objetos foram limpos com uma solução de etanol a 70% para evitar a presença de sinais olfativos. A exploração dos objetos foi definida como o animal direcionando sua face ao objeto até uma distância aproximada de 2 cm enquanto

observa, cheira ou toca-o. O índice de discriminação foi utilizado para analisar o tempo de exploração entre o objeto novo e o familiar. Este índice é calculado pela diferença entre a exploração do objeto familiar (TF) e o novo (TN) dividido pelo tempo de exploração total do objeto novo e familiar $[DI = (TN - TF) / (TN + TF)]$. Esse resultado pode variar entre valores negativos e positivos, onde valores positivos indicam mais tempo de exploração no objeto novo, valores negativos indicam mais tempo de exploração no objeto familiar, enquanto o valor zero indica a ausência de preferência.

Figura 1: Esquema representativo do protocolo experimental do teste de reconhecimento de objeto (TRO) de 1 hora ou 24 horas. Figura elaborada pelo programa BioRend.

4.5.2 Teste de localização do objeto (TLO)

O TLO é uma versão modificada do teste de reconhecimento de objetos (TRO), e avalia o desempenho da memória espacial (Mori et al., 2017). O aparelho consistiu em uma arena circular, igual ao do TRO citado acima. O TLO consistiu em três sessões: habituação, aquisição e teste. Um dia antes do experimento, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação na arena com duração de 10 minutos. O primeiro teste (T1) foi o de aquisição, no qual dois

objetos idênticos foram colocados simetricamente em uma linha horizontal na arena, a aproximadamente 5 cm. Nessa sessão os animais foram colocados na arena, de frente para a parede e exploraram os objetos durante 5 minutos. O segundo estudo (T2) ocorreu após um intervalo de 24 horas. Neste teste, um dos objetos foi deslocado ao longo de uma linha reta para outra posição conforme a **figura 2**. Em seguida, os animais exploraram novamente os objetos por um período de 5 minutos. Entre os animais, os objetos foram limpos com uma solução de etanol a 70% para evitar a presença de sinais olfativos. Para uma visão geral esquemática da configuração do TLO está representado na **figura 2**. A exploração dos objetos foi definida como o animal direcionando sua face ao objeto até uma distância aproximada de 2 cm enquanto observa, cheira ou toca-o. O índice de discriminação foi utilizado para analisar o tempo de exploração entre os objetos na posição antiga e na nova. Este índice foi calculado pela diferença entre a exploração do objeto na posição anterior (TA) e na nova posição (TN) dividido pelo tempo de exploração total dos objetos [$DI = (TN - TA) / (TN + TA)$]. Esse resultado pode variar entre valores negativos e positivos, onde valores positivos indicam mais tempo de exploração no objeto na nova posição, valores negativos indicam mais tempo de exploração no objeto na posição anterior, enquanto o valor zero indica a ausência de preferência.

Figura 2: Esquema representativo do protocolo experimental do teste de localização de objeto (TLO) de 24 horas. Figura elaborada pelo programa BioRend.

4.5.3 Medo condicionamento ao contexto (MCC)

No presente estudo foi avaliado o tempo de freezing dos animais de cada grupo experimental como um indicador de expressão da memória aversiva para verificação do processo de extinção. O protocolo foi realizado da seguinte maneira: **Dia 1:** 24 horas após o término do tratamento farmacológico, os animais foram colocados em uma caixa de condicionamento (contexto) (23x20x21cm - Insight Ribeirão Preto, Brasil) com um assoalho gerador de choques elétricos. Nesta sessão, após 90s, os animais receberam três choques inescapáveis e não sinalizados (0,85 mA / 2s de duração) em intervalos randomizados (variando de 30 a 60s). Após o último choque os animais foram mantidos na caixa por mais 60s. **Dia 2:** 24 horas após a sessão de choques elétricos, os animais foram re-expostos ao contexto durante 21 min sem a deflagração de choques elétricos para promoção da extinção da memória aversiva. Os 6 primeiros minutos da sessão foram utilizados para avaliar expressão do medo condicionado ao contexto. **Dia 3:** Os animais foram novamente colocados no contexto durante 5 min, sem deflagração de choques elétricos, com o intuito de se avaliar a consolidação da extinção da memória aversiva. Um esquema representativo desse método está representado na **Figura 3**.

Figura 3: Esquema representativo do protocolo do medo condicionado ao contexto. Figura elaborada pelo programa BioRend.

4.5.4 Medo condicionamento ao som (MCS)

Neste teste também foi avaliado o tempo de congelamento dos animais, como indicador da expressão da memória aversiva para avaliação do processo de extinção. O protocolo foi realizado da seguinte maneira: **Dia 1:** 24 horas após o término do tratamento, os animais foram colocados na câmara de condicionamento (contexto A) e após 2 minutos de habituação, receberam 5 estímulos que consistem em um tom (1 kHz, 70 dB) por 30s, co-terminando com um choque elétrico nas patas liberado pelas grades metálicas (0,45 mA, 1s). O tempo entre os estímulos variam de 20 a 120s. Após o último choque os animais foram mantidos na caixa por mais 1 min. Os dados serão apresentados em trials referentes a cada apresentação de choque/tom. **Dia 2:** Os animais foram expostos a um novo contexto (contexto B). Neste contexto permaneceram 2 minutos para habituação antes da apresentação de 18 tons com duração de 30 segundos cada, para promover o processo de extinção da memória aversiva. Nesse dia, os dados foram apresentados em trials referentes a blocos de 3 apresentações de tom. **Dia 3:** Os animais foram novamente colocados no

contexto B. Neste contexto permaneceram 2 minutos para habituação antes da apresentação de 9 tons com duração de 30 segundos cada para avaliação da consolidação da extinção. Nesse dia, os dados foram apresentados em trials referentes a blocos de 3 apresentações de tom. Um esquema representativo de cada dia do teste está representado na **Figura 4**.

Figura 4: Esquema representativo do protocolo do medo condicionado ao contexto. Figura elaborada pelo programa BioRender.

4.6 ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay)

Após as avaliações comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação, os encéfalos removidos e o CPFM e Hpc foram dissecados. Para realização do ELISA, as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise (NaCl 137 mM; Tris-HCl 20 mM pH 7.6; glycerol 10%) contendo um preparado de inibidores de proteases (Sigma Aldrich, EUA) e, em seguida, submetidas a centrifugação (12000rpm, 10 min, a 4°C). O sobrenadante obtido foi armazenado a – 80°C. Os níveis de β A, TNF- α e IL-1B foram medidos pelo método de ELISA através de kits conforme as instruções do fabricante. O conteúdo de proteínas totais foi medido pelo método de Bradford (1976) e usado para normalizar as amostras.

4.7 Western Blotting

Após a avaliação comportamental, os animais foram sacrificados por decapitação, os encéfalos removidos e CPFM e Hpc foi dissecado. Para se medir os níveis de proteína, as amostras foram homogenizadas em tampão de lise (RIPA, Sigma Aldrich, EUA), inibidor de protease (Sigma Aldrich, EUA) e os inibidores de fosfatase fluoreto de sódio (NaF) 1M e ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) 200mM e, em seguida, centrifugadas em 12000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. Então, o sobrenadante das amostras foi coletado e armazenado a -80°C.

Para isso, as proteínas das amostras foram separadas de acordo com o peso molecular por meio de eletroforese em gel gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Bio-Rad, EUA) e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA). Após o bloqueio com uma solução de leite em pó desnatado 5% em salina tamponada com tris (TBS) 0,05% de Tween 20 (TBST), a membrana foi incubada com os anticorpos primários de coelho contra anti-NeuN (1:1000, em BSA 5% e TBST, Millipore) e monoclonal de coelho anti-Iba1 (1:1000, BSA 5% e TBST, Abcam), GAPDH (1:5000 em leite em pó desnatado 5% e TBST, Sigma Aldrich, EUA) ou anticorpo primário de camundongo contra β -actina (1:1000 em BSA 5% e TBST, Santa Cruz, EUA), *overnight*, a 4°C. Em seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo (1:5000 em leite em pó desnatado 5% e TBST, Santa Cruz, EUA), por 2 horas, a temperatura ambiente e, então, revelada com reagente quimioluminescente (ECL, ThermoFischer, EUA) em um aparelho ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad, EUA). Por fim, a densidade óptica das amostras foi analisada pelo *software* ImageLab (Bio-Rad, EUA), sendo que os

valores obtidos foram corrigidos pelos valores de densidade óptica encontrados para β -actina ou GAPDH em cada amostra e expressos em relação ao controle, cuja média foi considerada 1

4.8 Determinação de nitrito e nitrato (NO_x)

Após os ensaios comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação com uso de guilhotina sem anestesia prévia, para dissecação do CPFM e Hpc e detecção de NO₂, como descrito por Bories (Bories e Bories, 1995). Nesse método, é utilizado a reação de redução do nitrato em nitrito na presença do nitrato redutase (E.C. 1.6.6.2) de *Aspergillus* sp e NADPH, associado a determinação das concentrações de nitrito pelo reagente de Griess. Os tecidos foram macerados em tampão fosfato, seguido por centrifugação a 15.000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi encubado durante a noite com a enzima nitrato redutase (Sigma) e NADPH (Sigma) a 37° em estufa de CO₂. As concentrações de NO₂ foram obtidas incubando-se 50 μ L de cada amostra com 50 μ L do reagente de Griess. Após período de incubação de 10 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância a 540 nm, estabelecendo-se a concentração por meio de curva-padrão de nitrito de sódio (Sigma). As leituras foram realizadas em triplicatas, sendo que os valores obtidos foram normalizados pela concentração de proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford. Os valores foram expressos em μ M de NO₂/mg de proteína.

4.9 Cultura de fatias humanas adultas

O tecido cortical foi obtido de pacientes submetidos à lobectomia temporal para remoção de foco epilético hipocampal, em casos de epilepsia refratária à

terapia medicamentosa. O material foi fornecido pelo Serviço de Neurocirurgia do HCRP, mediante aprovação, pelo comitê de ética do HCRP (processo nº17578/2015). O tecido cerebral foi coletado diretamente no Centro Cirúrgico e transportado ao laboratório em um tubo *Falcon* contendo 10 mL de meio de transporte (50% v/v HBSS suplementado com 10mM de Hepes e 3 mg/mL de glicose e 50% v/v de meio Neurobasal A) gelado e saturado com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). O tecido foi colocado em placa de Petri contendo solução de HBSS oxigenada e gelada para retirada da pia mater. O fragmento tecidual foi colado à base metálica do vibrátomo (Leica VT1000 S) obtendo-se fatias com espessura de 200 µm, que foram mantidas em imersão em HBSS gelado e oxigenado. Após o corte, as fatias foram transferidas para placas de cultura de 24 poços (1 fatia/poço), contendo 400 µL de meio Neurobasal A suplementado com 2% de B27, 1% de glutamax, 1% de penicilina/estreptomicina, e 0,25µg/mL de fungizona. No dia 1 *in vitro* (1DIV), ou seja, um dia após o processamento 1/3 do meio foi trocado por meio fresco acrescido de 50ng/mL de BDNF (Sigma). Em 2DIV as fatias foram tratadas com 500 nM de AβOs e 500 nM de AβOs + 100µM de SB366791 por 24 h. O veículo de AβOs foi utilizado como controle. Após esse período as fatias foram fixadas em 4% de paraformaldeído e submetidas ao protocolo de imunofluorescência para detecção de neurônios e micróglia. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para dosagem de TNF-α por ELISA através de kits conforme as instruções do fabricante.

4.10 Imunofluorescência e microscopia confocal

Após a avaliação comportamental, os animais foram anestesiados com uretana 5% e perfundidos transcardialmente com PBS 0,01M, seguido de paraformaldeído 4% tamponado em tampão fosfato 0,2M (PFA 4%).

Após a perfusão, os encéfalos foram retirados e mantidos, por 2 horas, em PFA 4% para pós-fixação. Em seguida, os mesmos ficaram em uma solução de sacarose 30% preparada em PBS 0,01M, por cerca de 24 horas, para crioproteção do material. Os encéfalos foram congelados em isopentano (Vetec, Brasil), mantido em gelo seco, à -40°C e, posteriormente, armazenados em freezer a temperatura de -80°C. O material, então, foi cortado em secções transversais de 30µm de espessura por meio de um criostato (Leica) com temperatura de -20°C, armazenado em solução anticongelante e, posteriormente, processado para imunofluorescência. Os tecidos foram permeabilizados com 0,3% de Triton-x100 por 1h, lavados 3 vezes com solução de lavagem (0,2% de Triton-x100 e 1% de BSA), e os aldeídos livres foram bloqueados com 100mM de glicina por 20min. Após 3 lavagens com solução de lavagem, os sítios inespecíficos foram bloqueados com 2% de BSA por 2h. Após esse período, as fatias foram incubadas por 24h a 4°C com solução dos anticorpos primários policlonal de camundongo anti-NeuN (1:1000, Millipore) e monoclonal de coelho anti-Iba1 (Abcam, 1:1000), todos diluídos em 2% de BSA + 0,1% de Triton X-100. Os tecidos foram lavados três vezes com solução de lavagem e incubados com solução contendo o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 488 (Life), anti-IgG de coelho Alexa Fluor 568 (Life), diluídos em 2% de BSA, e DAPI (1:16000), por 1h. Por fim, as lamínulas foram introduzidas na lâmina juntamente com o meio de montagem Prolong® gold anti-

fade reagent with DAPI. As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal Axio Observer combined with LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) ou microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e analisadas utilizando software Fiji by ImageJ.

4.11 Análise estatística

Os dados coletados foram expressos como média $\pm$ EPM. Os dados foram analisados por meio de ANOVA fatorial de uma via ou duas vias. O pós-teste *Tukey* foi utilizado para revelar diferenças específicas em todos os testes, considerando um nível de significância de $p < 0,05$.

5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

O esquema geral dos procedimentos se encontra no **Esquema 1 e 2**. Todos os protocolos foram realizados de acordo com os esquemas que estão descritos no item **4.5** da metodologia. Todos os testes comportamentais descritos abaixo tiveram início 24 horas após o último dia de tratamento, excluindo-se a necessidade de grupos experimentais com tratamento agudo.

5.1 Efeito da microinjeção do A β Os ou veículo intracerebroventricular após 24 horas sobre a memória de reconhecimento de objetos.

Camundongos C57/Bl6 de 7 semanas de idade receberam injeção intracerebroventricular de veículo ou A β Os. Após a recuperação do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a uma sessão de habituação por 10 minutos na arena circular, na qual foi avaliada a sua atividade locomotora. No dia seguinte após 24 horas da injeção de β A foi realizado o TRO

descrito no item **3.5.1** com intervalo de 1 hora para verificar se com 24 horas da injeção do A β Os os animais já apresentariam prejuízo de memória no TRO.

5.2 Efeito de uma única injeção do SB366791 sobre a memória de reconhecimento de objetos (TRO) em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.

Com o intuito de verificar se apenas uma injeção de SB366791 apresentava efeito sobre a memória de reconhecimento de objetos, foi realizado a microinjeção do A β Os (i.c.v) ou veículo (DMSO 1%) em camundongos C57/Bl6 de 7 semanas, e 24 horas após foi realizado o tratamento com uma única injeção intraperitoneal de SB366791 (0,15 mg/Kg). Posteriormente após 24 horas do tratamento foi realizado o TRO de memória de curto prazo (1 hora) como descrito no item **3.5.1**.

5.3 Efeitos do tratamento repetido com SB366791 sobre a memória de reconhecimento de objetos (TRO) em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.

Camundongos C57/Bl6 de 7 semanas de idade que receberam injeção intracerebroventricular de veículo ou A β Os foram tratados com um antagonista de receptores TRPV1, SB366791 (0,15 mg/Kg) ou veículo (DMSO 0,1%) por um período de 14 dias. 24 horas após o término do tratamento os animais foram submetidos a uma sessão de habituação por 10 minutos na arena circular, na qual será também avaliada a sua atividade locomotora. No dia seguinte foi realizado o TRO descrito no item **3.5.1** com intervalo de uma hora ou 24 entre T1 e T2 para avaliação do efeito da droga sobre a memória de curto prazo ou longo prazo.

5.4 Efeitos do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 sobre a memória de localização (TLO) em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.

Camundongos C57/Bl6 de 7 semanas de idade que receberam injeção intracerebroventricular de veículo ou A β Os foram tratados com um antagonista de receptores TRPV1, SB366791 ou veículo (DMSO 0,1%) por um período de 14 dias. 24 horas após o término do tratamento os animais foram submetidos a uma sessão de habituação por 10 minutos na arena circular, na qual foi também avaliada a sua atividade locomotora. No dia seguinte foi realizado o TLO descrito no item 4.5.2 com intervalo de 24 horas entre T1 e T2 para avaliação do efeito da droga sobre a memória de localização.

5.5 Efeitos do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 sobre a extinção de memória aversiva associada ao contexto em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.

C57/Bl6 de 7 semanas de idade que receberam injeção intracerebroventricular de veículo ou A β Os foram tratados com o antagonista de receptores TRPV1, SB366791 (0,15 mg/Kg) ou veículo (DMSO 10%) por um período de 14 dias. 24 horas após o término do tratamento os animais foram submetidos ao protocolo de extinção ao contexto descrito no item 4.5.3.

5.6 Efeitos do tratamento repetido com um antagonista de receptores TRPV1 sobre a extinção de memória aversiva associada ao som em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular.

C57/Bl6 de 7 semanas de idade que receberam injeção intracerebroventricular de veículo ou A β Os foram tratados com o antagonista de receptores TRPV1, SB366791 (0,15 mg/Kg) ou veículo (DMSO 10%) por um período de 14 dias. 24 horas após o término do tratamento os animais foram submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado ao som como descrito no item 4.5.4.

5.7 Participação dos receptores TRPV1 sobre a memória de reconhecimento de objetos (TRO) em camundongos que receberam A β Os por injeção intracerebroventricular.

Camundongos C57/Bl6 de 7 semanas de idade knockout para receptor TRPV1 receberam injeção intracerebroventricular de A β Os. Após um período de 14 dias, semelhante ao tempo de tratamento com o SB36679 os animais foram submetidos a uma sessão de habituação por 10 minutos na arena circular, na qual foi também avaliada a sua atividade locomotora. No dia seguinte foi realizado o TRO descrito no item 3.5.1 com intervalo de uma hora e 24 entre T1 e T2 para avaliação da participação desse receptor sobre a memória de curto prazo ou longo prazo em animais com a DA.

5.8 Participação dos receptores TRPV1 sobre a memória aversiva do condicionamento ao som (MCS) em camundongos que receberam AβOs ou por injeção intracerebroventricular.

Camundongos C57/Bl6 de 7 semanas de idade knockout para receptor TRPV1 receberam injeção intracerebroventricular do AβOs. Após um período de 14 dias, semelhante ao tempo de tratamento com o SB36679 os animais foram submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado ao som como descrito no item **4.5.4.** para avaliação da participação desse receptor sobre a memória aversiva no processo de extinção do condicionamento ao som em animais com a DA.

5. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Efeito da microinjeção de A β Os ou veículo intracerebroventricular após 24 horas sobre a memória de reconhecimento de objetos.

Para verificar se a microinjeção do oligômero de β A ocasionaria prejuízo na memória dos animais, realizamos um grupo experimental fazendo apenas a microinjeção do A β Os (i.c.v) ou veículo e posteriormente, 24 horas após, foi realizado o teste de memória de reconhecimento de objetos (TRO) de curto prazo, no intervalo de 1 hora. Observa-se na **figura 5**, que o grupo de animais que receberam o A β Os apresentaram um prejuízo na performance de reconhecimento de objetos após 24 horas da microinjeção, o que não aconteceu com o grupo veículo ($t = 2,265$; $df = 10$; $p < 0,05$), indicando que após 24 horas os animais já apresentam um déficit cognitivo.

Figura 5: Microinjeção de A β Os (i.c.v) promove prejuízo após 24 horas na memória de curto prazo (1h) no teste de reconhecimento de objeto em camundongos com DA. (A) Distância percorrida durante a habituação e (B) efeito da microinjeção do A β Os (i.c.v) no comprometimento da memória em camundongos no teste de reconhecimento de objetos (TRO) de curto prazo. Dados apresentados como a média $\pm$ EPM ($n=4-5$ animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo obtidas por teste -t.

6.2 Uma única injeção do SB366791 não apresenta efeito sobre a memória de reconhecimento de objetos em camundongos que receberam AβOs ou veículo por injeção intracerebroventricular.

Ao observar que a microinjeção do AβOs (i.c.v) foi capaz de promover um prejuízo no teste de memória após 24 horas da microinjeção, um próximo passo foi verificar se apenas uma única injeção do antagonista de receptores TRPV1 (SB366791) na dose de 0,15mg/Kg, i.p, apresentava efeito sobre esse prejuízo. Realizamos o experimento conforme o protocolo descrito no **esquema 1**, ou seja, foi realizado a microinjeção do AβOs (i.c.v) ou veículo (DMSO 1%), 24 horas após foi realizado o tratamento com uma única injeção intraperitoneal de SB366791 e após 24 horas foi realizado mais uma vez o TRO de curto prazo (1 hora). Com isso, observa-se pela ANOVA de duas vias que houve efeito da condição ($F_{1,18} = 46,47$, $p < 0,05$). Nesse sentido, corroborando com os resultados acima, o pós-teste demonstra que 48 horas após a microinjeção do AβOs, o grupo veí/ AβOs apresentou um prejuízo no índice de discriminação dos objetos, entretanto esse efeito não foi revertido com uma única injeção do SB366791, observado pelo grupo SB366791/AβOs.

Figura 6: Única injeção de SB366791 (i.p) não apresenta efeito na recuperação da memória de curto prazo (1h) no teste de reconhecimento de objeto em camundongos com DA. (A) Distância percorrida durante a habituação e (B) efeito do

tratamento com SB366791 (i.p) no comprometimento da memória em camundongos infundidos com A β Os (i.c.v) no teste de reconhecimento de objetos (TRO) de curto prazo. Dados apresentados como a média $\pm$ EPM (n=5-6 animais/grupo). *p<0,05 em relação ao grupo veí/veí; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.3 Tratamento crônico com SB366791 resgata prejuízo da memória de curto e longo prazo em camundongos com DA receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular

O próximo passo foi verificar se o tratamento repetido de 14 dias com o antagonista de receptores TRPV1 (SB366791) apresentava efeito no TRO. Para isso o protocolo foi realizado como descrito no **esquema 2**. O primeiro experimento realizado foi para verificar o efeito da droga na memória de curto prazo (1 hora) (**Figura 7**). Os resultados encontrados demonstram que houve efeito da condição ($F_{1,27} = 8,871$; $p < 0,05$), do tratamento ($F_{1,27} = 17,23$; $p < 0,05$) e houve interação entre os fatores ($F_{1,27} = 11,82$; $p < 0,05$). Adicionalmente o pós-teste revelou que o grupo veí/A β Os apresentou prejuízo no TRO quando comparado ao controle ($p < 0,05$), e que o prejuízo ocasionado pela microinjeção do A β Os foi prevenido com o tratamento com SB366791/A β Os ($p < 0,05$). Posteriormente, a próxima etapa foi verificar se o SB366791 também apresentava efeito na memória de longo prazo (24 horas) (**Figura 7B**). Os resultados demonstram que houve efeito do tratamento ($F_{1,28} = 14,47$, $p < 0,05$) e houve interação ($F_{1,28} = 11,15$, $p < 0,05$). No mesmo sentido dos dados citados acima, o pós-teste revelou que o grupo veí/A β Os apresentou prejuízo no TRO quando comparado ao controle ($p < 0,05$), e que o prejuízo ocasionado pela microinjeção do oligômero de β A também foi prevenida com o tratamento com SB366791/A β Os ($p < 0,05$). Dessa forma, é possível observar que os receptores

TRPV1 parecem ter uma participação no processo de memória, uma vez que o antagonismo desses receptores apresentou um efeito protetor no prejuízo de memória induzido pela microinjeção do oligômero de β A.

Figura 7: Tratamento com SB366791 (i.p) resgata prejuízo da memória de curto prazo (1h) e longo prazo (24h) no teste reconhecimento de objeto em camundongos com DA. (A) Distância percorrida durante a habituação e efeito do tratamento com SB366791 (i.p) no comprometimento da memória em camundongos infundidos com AβOs (i.c.v) no teste de reconhecimento de objetos (TRO) de curto prazo e de longo prazo (B). Dados apresentados como a média $\pm$ EPM (n=7-8 animais/grupo). *p<0,05 em relação ao grupo veí/veí, #p<0,05 em relação ao grupo Veí/AβOs; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.4 Tratamento crônico com SB366791 resgata prejuízo da memória de localização em camundongos com DA receberam AβOs ou veículo por injeção intracerebroventricular

Após verificar o efeito da microinjeção do AβOs e do tratamento com o SB366791 no TRO, resolvemos avaliar o efeito desse mesmo protocolo no desempenho da memória espacial através do teste de localização de objetos

(TLO) de longo prazo (24 horas). Os resultados demonstraram que houve efeito do tratamento ($F_{1,23} = 4,676$; $p < 0,05$) e interação entre os fatores ($F_{1,23} = 5,081$; $p < 0,05$). A análise do pós-teste demonstrou que a microinjeção do A β Os também promoveu um prejuízo na memória espacial de longo prazo dos animais quando comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$) e que o tratamento repetido com o SB366791 foi capaz de prevenir esse prejuízo ($p < 0,05$). Os animais não apresentaram diferenças na locomoção durante o período de habituação ($p > 0,05$).

Figura 8: Tratamento com SB366791 (i.p) resgata prejuízo da memória espacial em camundongos com DA. (A) Distância percorrida no dia da habituação (B) Efeito do tratamento com SB366791 (i.p) no comprometimento da memória em camundongos infundidos com A β Os (i.c.v) no teste de localização de objetos (TLO) na memória de longo prazo. Dados apresentados como a média $\pm$ EPM (n=5-8 animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo veí/veí, # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí/A β Os; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.5 Tratamento crônico com SB366791 recupera prejuízo na consolidação da extinção da memória aversiva no medo condicionado ao contexto em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular

A **figura 9** representa o perfil da extinção da memória de condicionamento aversivo. Observa-se que no primeiro dia todos os grupos condicionaram, ou

seja, ao longo do tempo adquiriram a memória de medo ($F_{3,108} = 69,39$; $p < 0,05$), não havendo diferença entre a condição veículo e A β Os ($p > 0,05$) e do tratamento SB366791 e veículo ($p < 0,05$). No mesmo sentido, na sessão de extinção todos os grupos são capazes de adquirir a memória de extinção no decorrer da sessão ($F_{6,189} = 46,19$; $p < 0,05$). Contudo, no terceiro dia do processo de extinção, é possível observar que houve efeito da condição ($F_{1,27} = 8,324$; $p < 0,05$), do tratamento ($F_{1,27} = 9,657$; $p < 0,05$) e houve interação entre os fatores ($F_{1,27} = 12,81$; $p < 0,05$). O pós-teste demonstrou que os animais do grupo veí/A β Os apresentaram déficit na consolidação na extinção da memória aversiva, ou seja, esses animais não foram capazes de reter a nova memória adquirida quando comparado ao grupo de animais veículo. Adicionalmente os animais que receberam o tratamento com SB366791 representados pelo grupo SB366791/A β Os não apresentaram prejuízo na consolidação dessa nova memória, indicando um efeito protetor dessa droga frente a memórias aversivas relacionada ao contexto.

Figura 9: Tratamento com SB366791 (i.p) resgata prejuízo da memória de consolidação da extinção no modelo de medo condicionado ao contexto em camundongos com DA. (A) Efeito do tratamento com SB366791 (i.p) no comprometimento da memória em camundongos infundidos com A β Os (i.c.v) no teste do medo condicionado ao contexto (MCC). (B) Dia do teste representado em barras. Dados apresentados como a média $\pm$ EPM ($n=5-8$ animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação

ao grupo veí/veí, # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí/A β Os; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.6 Tratamento crônico com SB366791 resgata prejuízo da consolidação da extinção da memória no medo condicionado ao som em camundongos que receberam A β Os ou veículo por injeção intracerebroventricular

O próximo passo foi verificar o efeito da injeção do A β Os e do tratamento com SB366791 na memória de medo condicionado ao som. **A Figura 10** demonstra que no primeiro dia todos os grupos condicionaram da mesma forma após receber o choque pareado com o som ao longo do tempo ($F_{4,130} = 45,2$; $p < 0,05$), porém não houve efeito da condição ($F_{3,130} = 1,502$; $p < 0,05$) e nem interação entre os fatores ($F_{12,130} = 0,373$; $p > 0,05$). Já no segundo dia, observa-se que houve efeito da condição ($F_{3,156} = 35,35$; $p < 0,05$), do tempo ($F_{5,156} = 20,47$; $p < 0,05$), porém não houve interação entre os fatores ($F_{15,156} = 0,485$; $p < 0,05$) no processo de extinção da memória aversiva ao som. A análise do pós-teste revelou que os animais do grupo Veí/A β Os apresentaram um prejuízo no processo da aquisição de uma nova memória quando comparado ao grupo Veí/Veí ($p < 0,05$). Já os animais que receberam o tratamento com o antagonista de receptores TRPV1 (SB366791) não apresentaram prejuízo da memória de extinção quando comparado ao grupo dos animais que receberam Veí/A β Os ($p < 0,05$). Porém, ao analisar separado grupo por grupo, é possível notar que todos os grupos conseguem extinguir a memória aversiva ao comparar o primeiro ponto da reexposição ao último ponto ($p < 0,05$). Adicionalmente, no terceiro dia, dia do teste da consolidação da memória de extinção, percebe-se que houve efeito da condição ($F_{1,26} = 7,469$; $p < 0,05$), do tratamento ($F_{1,26} = 5,777$; $p < 0,05$) e houve interação entre os fatores ($F_{1,26} = 12,65$; $p < 0,05$). A análise do

pós teste revelou os animais do grupo Veí/A β Os apresentaram um prejuízo na consolidação da memória de extinção no condicionamento ao som quando comparado ao grupo veículo ($p<0,05$). Porém, os animais que receberam o tratamento com SB366791 representados pelo grupo SB366791/A β Os não apresentaram déficit na consolidação dessa nova memória.

Figura 10: Tratamento com SB366791 (i.p) resgata prejuízo da memória de consolidação da extinção no modelo de medo condicionado ao som em camundongos com DA. (A) Efeito do tratamento com SB366791 (i.p) no comprometimento da memória em camundongos infundidos com A β Os (i.c.v) no teste do medo condicionado ao som (MCS). (B) Apenas o dia do teste representado em barras. Dados apresentados como a média $\pm$ EPM ($n=5-8$ animais/grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo veí/veí, # $p<0,05$ em relação ao grupo Veí/A β Os; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.7 Administração intracerebroventricular de A β Os induz inflamação em regiões do cérebro como CPFM e Hpc e o tratamento com SB366791 diminui a expressão das citocinas envolvidas nesses processos inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β

Na doença de Alzheimer o depósito de A β é capaz de induzir uma regulação positiva de mediadores inflamatórios. Após a injeção intracerebroventricular de A β Os, nós fomos avaliar a expressão das citocinas envolvidas nesse processo inflamatório. A análise da expressão dessas citocinas

demonstrou que a administração do A β Os promoveu um aumento de IL-1 β ($F_{1,19} = 5,571$; $p < 0,05$) e TNF- α ($F_{1,22} = 8,203$; $p < 0,05$) no CPFM quando comparado ao grupo controle. No mesmo sentido, esses mesmos animais também apresentaram um aumento de IL-1 β ($F_{1,23} = 2,58$; $p < 0,05$) e TNF- α ($F_{1,23} = 6,75$; $p < 0,05$) no hipocampo. Adicionalmente, a análise de pós-teste demonstrou que o grupo que recebeu o SB366791/A β Os apresentou uma diminuição das citocinas inflamatórias tanto no CPFM quanto no hipocampo. Demonstrando dessa forma, que os A β Os induzem uma resposta inflamatória em regiões cerebrais que é refletido pelo aumento dessas citocinas inflamatórias e que o tratamento com SB366791 é capaz de diminuir essas alterações.

Figura 11: Tratamento com SB366791(i.p) diminui a expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α em regiões do cérebro em camundongos com DA. Efeito do tratamento com SB366791 (i.p) na dosagem das citocinas inflamatórias IL-1 β (A) e TNF- α (C) no córtex pré-frontal e IL-1 β (B) e TNF- α (D) no hipocampo de camundongos infundidos com A β Os (i.c.v). Dados apresentados como a média $\pm$ EPM (n=5-8 animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo veí/veí, # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí/A β Os; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.8 Injeção de AβOs e tratamento com SB366791 não apresenta efeito sobre o nível de substâncias oxidantes, como os metabólitos do óxido nítrico (NOx) no córtex e hipocampo de camundongos com DA

Ao analisar o efeito da injeção do AβOs, observa-se que não houve efeito sobre os metabólitos do óxido nítrico tanto no CPFM como no hipocampo respectivamente ($p>0,05$). No mesmo sentido, o tratamento com o SB366791 também não apresentou alteração na dosagem do NO nas mesmas regiões cerebrais ($p>0,05$).

Figura 12: Tratamento com SB366791 (i.p) não apresenta efeito na dosagem de óxido nítrico nas regiões do córtex e hipocampo em camundongos com DA. Efeito do tratamento com SB366791 (i.p) na dosagem dos metabólitos do óxido nítrico (A) no córtex pré-frontal (B) hipocampo de camundongos infundidos com AβOs (i.c.v). Dados apresentados como a média $\pm$ EPM ($n=7-8$ animais/grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo veí/veí, # $p<0,05$ em relação ao grupo Veí/AβOs; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.9 Injeção de AβOs e tratamento com SB366791 não apresenta efeito sobre o número de células NeuN+ e Iba-1+ no córtex e hipocampo de camundongos com DA.

Ao tentar investigar o possível mecanismo relacionado com as alterações comportamentais, o seguinte passo foi verificar a quantidade de células positivas

pra NeuN e Iba-1. A **figura 13** demonstra que não houve efeito da condição ($F_{1,8} = 0,26$; $p > 0,05$), do tratamento ($F_{1,8} = 0,39$; $p > 0,05$) e nem interação entre os fatores ($F_{1,13} = 0,86$; $p > 0,05$). A análise do pós-teste demonstrou que não houve diferença entre os grupos na quantidade de células Iba-1 positivas no CPFM. Adicionalmente, também não houve efeito da condição ($F_{1,8} = 0,39$; $p > 0,05$), do tratamento ($F_{1,8} = 0,007$; $p > 0,05$) na quantidade de células positivas pra NeuN, porém houve interação entre os fatores ($F_{1,8} = 9,27$; $p < 0,05$). A análise do pós-teste também demonstrou que não houve diferença entre os grupos estudados. Os resultados encontrados no hipocampo foram semelhantes, não houve efeito da condição ($F_{1,11} = 2,39$; $p > 0,05$), do tratamento ($F_{1,11} = 0,16$; $p > 0,05$), porém houve interação entre os fatores ($F_{1,11} = 9,71$; $p < 0,05$) na quantidade de células positivas de Iba-1 no hipocampo. A análise do pós-teste demonstrou que não houve diferença entre os grupos. Relacionado a NeuN no hipocampo, não houve efeito da condição, do tratamento e nem interação entre os fatores ($p > 0,05$).

Figura 13: Efeito da microinjeção de AβOs (i.c.v) e do tratamento com SB366791 (i.p) sobre a quantidade de células positivas de NeuN e Iba-1 no córtex pré-frontal e hipocampo de animais com DA. Dados apresentados como a média ± EPM (n=2-5 animais/grupo). *p<0,05 em relação ao grupo veí/veí, #p<0,05 em relação ao grupo Veí/AβOs; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.10 Dosagem de A β Os no hipocampo nas primeiras horas após a administração intracerebroventricular.

Levando em consideração que uma das principais características da DA é o depósito da proteína β A, o intuito desse experimento foi observar se a microinjeção do oligômero de A β promoveria o depósito de β A em regiões cerebrais como o hipocampo. Dessa forma, foi realizada dosagem do oligômero nas primeiras horas após a injeção intracerebroventricular. Observa-se na **figura 14** que não houve diferença entre o grupo veículo e que recebeu o A β Os no tempo de quatro horas ($t = 1,388$; $d f = 5$, $p > 0,05$), 24 horas ($t = 1164$; $d f = 10$, $p > 0,05$) e 48 horas ($t = 0,604$ $d f = 6$, $p > 0,05$).

Figura 14: Dosagem de A β Os no hipocampo nos períodos de 4 horas, 24 horas, e 48 horas após a microinjeção de A β Os (i.c.v) em camundongos. Dados apresentados como a média $\pm$ EPM ($n=4-5$ animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo; obtidas por teste -t.

6.11 Animais knockout TRPV1 não apresentam prejuízo da memória de curto ou longo prazo em camundongos com DA receberam AβOs por injeção intracerebroventricular

Para confirmar a participação do receptor TRPV1 no envolvimento do prejuízo de memória induzido pelo AβOs, o próximo passo foi utilizar animais knockout para esse receptor. Esses animais foram injetados com AβOs (i.c.v) e posteriormente foi realizado o teste de reconhecimento de objeto de memória de curto e longo prazo. É possível observar na **Figura 15** que nenhum dos grupos estudados apresentaram diferença na locomoção no dia da habituação ($F_{2,14} = 1,79$; $p > 0,05$). Contudo, os animais que receberam o AβOs apresentam um prejuízo tanto na memória de curto prazo ($F_{2,14} = 22,22$; $p < 0,05$) quanto de longo prazo ($F_{2,14} = 10,09$; $p < 0,05$), de acordo com os resultados citados anteriormente. Adicionalmente, nós observamos que os animais -/- TRPV1 não apresentaram esse prejuízo na memória de curto prazo e longo prazo respectivamente, apresentando um perfil de comportamento semelhante ao grupo veículo ($p > 0,05$). Esses dados corroboram com os dados do mesmo teste comportamental, associado com o tratamento crônico com SB36679, indicando que esse receptor parece ter um efeito importante no prejuízo de memória induzido pelo AβOs.

Figura 15: Animais knockout TRPV1 não apresentam prejuízo da memória de curto ou longo prazo em camundongos com DA. Participação do receptor TRPV1 no comprometimento da memória de curto prazo (B) e longo prazo (C) em camundongos infundidos com A β Os (i.c.v) no teste de reconhecimento de objetos (TRO). Dados apresentados como a média $\pm$ EPM (n= 5-7 animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, # $p < 0,05$ em relação ao grupo A β Os; obtidas por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.12 Animais knockout TRPV1 não apresentam prejuízo da memória no medo condicionado ao som (MCS) em camundongos com DA receberam A β Os por injeção intracerebroventricular

Após verificar que os animais knockout para o receptor TRPV1 não apresentavam prejuízo de memória no TRO, nós decidimos avaliar o papel desse receptor também no teste do medo condicionado ao som. Os resultados obtidos foram semelhantes ao citado anteriormente. Observa-se **na figura 16** que no primeiro dia todos os grupos condicionam ao longo do tempo após receber o choque pareado com o som ($F_{4,70} = 48,75$; $p < 0,05$). Já no segundo dia, é possível verificar que houve efeito tanto da condição ($F_{4,84} = 29,8$; $p < 0,05$), quanto do tempo ($F_{2,84} = 4,663$; $p < 0,05$), porém não houve interação entre os fatores ($F_{10,84} = 0,91$; $p > 0,05$) no processo de extinção da memória aversiva ao som. A análise de pós-teste revelou que os animais do grupo A β Os apresentaram um prejuízo no processo da aquisição de uma nova memória quando comparado ao grupo Veículo ($p < 0,05$). Já os animais knockout TRPV1 apresentaram um perfil da memória de extinção semelhante ao grupo controle, ou seja, não apresentaram prejuízo na extinção da memória aversiva. Porém também houve a extinção da memória aversiva em todos os grupos estudados. Adicionalmente, no terceiro dia, dia do teste da consolidação da memória de extinção, percebe-se efeito da condição ($F_{12,14} = 6,402$; $p > 0,05$). A análise de pós-teste revelou os animais do

grupo A β Os apresentaram um prejuízo na consolidação da memória de extinção no condicionamento ao som quando comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$). Porém, os animais knockout TRPV1 apresentaram não apresentaram prejuízo na consolidação dessa nova memória. Esses resultados também são semelhantes aos resultados do tratamento com SB366791

Figura 16: Animais knockout TRPV1 não apresentam prejuízo na consolidação da memória de extinção no medo condicionado ao som. (A) Participação do receptor TRPV1 no comprometimento da memória de extinção no modelo de medo condicionado ao som de camundongos infundidos com A β Os (i.c.v.). (B) Dia do teste representado em barras. Dados apresentados como a média $\pm$ EPM ($n = 5-7$ animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, # $p < 0,05$ em relação ao grupo A β Os; obtidas por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.13 Animais knockout TRPV1 apresentam um aumento na expressão das citocinas envolvidas nos processos inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β .

Posteriormente, o próximo passo foi avaliar a expressão das citocinas envolvidas no processo inflamatório. Foi possível observar na **figura 17** que a administração do A β Os promoveu um aumento de IL-1 β ($F_{2,12} = 7,196$; $p > 0,05$) e TNF- α ($F_{2,16} = 5,796$; $p < 0,05$) no CPFM quando comparado ao grupo controle. No mesmo sentido, esses mesmos animais também apresentaram um aumento

de IL-1 β ($F_{2,15} = 7,981$; $p < 0,05$ e TNF- α ($F_{2,12} = 7,289$; $p < 0,05$) no hipocampo. Adicionalmente, os animais knockout TRPV1 apresentaram uma menor liberação das citocinas inflamatórias tanto no CPFM quanto no hipocampo ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem que a ausência dos receptores TRPV1 parece ter uma função de neuroproteção, uma vez que os A β Os induzem uma resposta inflamatória em regiões cerebrais e a ausência desses receptores diminuem essas alterações.

Figura 17: Animais knockout TRPV1 apresentam uma diminuição na expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α em regiões do cérebro em camundongos com DA. Participação do receptor TRPV1 na liberação das citocinas inflamatórias IL-1 β (A) e TNF- α (C) no córtex pré-frontal e IL-1 β (B) e TNF- α (D) no hipocampo de camundongos infundidos com A β Os (i.c.v). Dados apresentados como a média $\pm$ EPM (n=4-6 animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo veí/veí, # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veí/A β Os; obtidas por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.14 Efeito da microinjeção de A β Os na quantidade de células positivas para NeuN

Nós realizamos uma análise qualitativa de 1 animal representante de cada grupo através da imunofluorescência (**Figura 18**). É possível observar que o tratamento com o A β Os apresenta um indicativo em diminuir as células NeuN positivas, que foi avaliada pela intensidade de fluorescência, quando comparado ao grupo veículo. Em contrapartida, os animais knockout TRPV1 parecem ter um efeito em prevenir essas alterações. São necessárias maiores quantificações para confirmar os resultados observados.

Figura 18. 6.14 Efeito da microinjeção de AβOs na quantidade de células positivas para NeuN em animais knockout. (A) Fotomicrografias representativas da expressão dos marcadores de NeuN (NeuN, fluorescência verde) e de núcleo (DAPI, fluorescência azul) para os respectivos grupos experimentais em regiões do córtex pré-frontal (A) e hipocampo. (B). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal Axio Observer acoplado ao sistema multifoton LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) ou microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e analisadas utilizando software Fiji by ImageJ. Barra de escala 100 μm

6.15 Incubação com A β Os parece promover um aumento da citocina inflamatória TNF- α em fatias de cérebro humano

O uso de amostras de tecido humano adulto é particularmente importante para o entendimento das neuropatologias humanas. Nesse experimento, nós seguimos a metodologia descrita em 4.2. O objetivo desse experimento foi verificar se os dados eram semelhantes aos dos animais. É possível observar que não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F_{2,3} = 1,2$; $p < 0,05$), uma vez que o número da amostra é pequeno. Isso é um fator limitante em amostras de humanos. Entretanto, as fatias que foram tratadas com A β Os apresentam uma tendência em induzir a liberação de TNF- α e o tratamento com SB366791 parece diminuir essa resposta inflamatória.

Figura 19: Expressão de TNF- α em culturas de fatias do córtex de cérebro humano adulto. Avaliação da liberação de TNF- α após tratamento com A β Os e efeito do tratamento de 24h com SB366791. Dados apresentados como a média $\pm$ EPM (n=2 animais/grupo). Dados obtidos por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.16 Incubação com A β Os interfere na quantidade de células de NeuN em fatias de cérebro humano

Ao analisar as fatias de cérebro humano através da imunofluorescência (**figura 20**), nós observamos que o tratamento com o A β Os apresenta uma tendência a diminuir as células NeuN positivas, que foi avaliada pela intensidade de fluorescência, quando comparado ao grupo veículo. Em contrapartida, o tratamento com SB366791 parece ter um efeito em prevenir essas alterações. No entanto, esses dados são apenas especulações, já que a escassez das amostras dos pacientes é um fator limitante para o desenvolvimento do experimento. Sendo assim, são necessários mais experimentos para confirmar os dados abaixo. Adicionalmente, levando em consideração que o nosso tratamento é baseado no antagonismo dos receptores TRPV1, nosso próximo passo foi observar se esses receptores estavam expressos em micróglia e em neurônios nas fatias de córtex de humano. É possível observar na **Figura 21**, uma co-localização desses receptores tanto com micróglia (painel superior), quanto com neurônios do córtex (painel inferior).

Figura 20. Efeitos da incubação com AβOs e SB366791 na quantidade de células positivas de NeuN em fatias de cérebro humano. (A) Fotomicrografias representativas da expressão dos marcadores de NeuN (NeuN, fluorescência verde) e de núcleo (DAPI, fluorescência azul) para os respectivos grupos experimentais. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência para NeuN entre os diferentes grupos. As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal Axio Observer acoplado ao sistema multifoton LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) ou microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e analisadas utilizando software Fiji by ImageJ. Barra de escala 100 μm

Figura 21. Fotomicrografias representativas da expressão dos receptores TRPV1 em fatias de cérebro humano. Painel superior: Marcadores de TRPV1 (fluorescência verde); Iba-1 (fluorescência vermelha) e de núcleo (DAPI, fluorescência azul). Painel inferior: Marcadores de pTRPV1 (fluorescência vermelha); NeuN (fluorescência verde) e de núcleo (DAPI, fluorescência azul). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal Axio Observer acoplado ao sistema multifoton LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) ou microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Barra de escala 100 μm

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O prejuízo da memória de aprendizagem é uma das principais características da doença de Alzheimer (DA) (Jayant et al., 2016b, 2016a). No presente estudo, nós demonstramos que a microinjeção (i.c.v) dos oligômeros da proteína β A induz um déficit de memória e aprendizado nos camundongos, além de promover um aumento nas citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α . Além disso, a administração do antagonista dos receptores TRPV1 (SB366791) melhora significativamente a memória que foi prejudicada pelo A β Os. No mesmo sentido, animais knockout para o receptor TRPV1 também melhoram o prejuízo da memória induzida pelo A β Os. Adicionalmente a isso, o tratamento com SB366791 previne o aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α na região do CPFM e hipocampo. Portanto, esse estudo fornece evidências de que o bloqueio dos receptores TRPV1 por SB366791 é capaz de melhorar as funções cognitivas e inflamatórias no modelo da DA em camundongos.

Diversos estudos na literatura demonstram que a deposição de A β facilita a perda neuronal, disfunção cognitiva e dano estrutural no cérebro (Chen et al., 2017; Faucher et al., 2016; Hamel, 2015; J. Kim et al., 2019; Lourenco et al., 2019). Ao analisar cérebros de pacientes com DA, a presença de A β é umas das principais características da doença. Consequentemente, à medida que ocorre a progressão da doença, esses pacientes apresentam diversos prejuízos, dentre eles encontra-se a perda de memória (Canter et al., 2016), que por sua vez, refere-se à capacidade de lembrarmos de experiências ou conhecimentos previamente adquiridos e armazenados (Bisaz et al., 2014; Fietta and Fietta, 2011).

No nosso trabalho, nós observamos que a injeção intracerebroventricular do AβOs após 24 horas já foi capaz de promover um prejuízo na memória de curto prazo (1h). Adicionalmente, nós observamos que a injeção de AβOs após 21 dias promoveu um prejuízo na memória de curto prazo e longo prazo (24h) avaliada pelo TRO. No mesmo sentido, ao analisar a memória espacial, nós também observamos que a injeção do AβOs promoveu um prejuízo na memória de longo prazo avaliada pelo TLO. Alguns estudos que também realizaram a microinjeção de Aβ ou APP/PS1 observaram resultados semelhantes ao nosso no TRO (Aso et al., 2012b; Chen et al., 2017; Lourenco et al., 2019). Esses dados são importantes, uma vez que a avaliação da memória no TRO parece fazer uso de algumas regiões do cérebro e sistemas de neurotransmissores, incluindo o hipocampo e córtex (Balderas et al., 2013; Decurtis and Pare, 2004; Winters et al., 2008) que são uma das principais regiões acometidas pela DA. Além disso, esses resultados refletem o prejuízo de memória clinicamente encontrado em pacientes com Alzheimer.

Como citado anteriormente, a memória pode ser definida como a capacidade de adquirir, processar, armazenar e recuperar informações (Fietta and Fietta, 2011). Uma memória previamente consolidada, ou seja, armazenada, quando lembrada, pode passar pelo processo de extinção, que refere-se à formação de uma nova memória, paralelamente à informação previamente adquirida (VanElzakker et al., 2014). Nossos resultados demonstraram que a injeção intracerebroventricular do AβOs não foi capaz de alterar a aquisição e extinção da memória aversiva no teste do medo condicionado ao contexto, ou seja, todos os grupos estudados são capazes de aprender a tarefa do condicionamento aversivo, bem como adquirir a memória de extinção,

entretanto, os animais que receberam o A β Os apresentam um déficit na consolidação da extinção da memória adquirida. O mesmo foi observado no teste do medo condicionado ao som, onde todos os grupos aprenderam o condicionamento aversivo, no entanto, apesar dos animais que receberam o A β Os apresentarem um aumento na expressão do medo condicionado ao som, quando comparado com o grupo veículo, todos foram capazes de adquirir a memória de extinção ao longo da sessão. Porém, após 24h, na reexposição dos animais ao som, os animais A β Os apresentaram um prejuízo na consolidação da memória de extinção.

A memória de extinção, por ser uma nova memória formada, precisa ser consolidada (Wichert et al., 2013). Várias estruturas cerebrais incluindo a amígdala, hipocampo e o córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC) estão envolvidas no condicionamento e na extinção do medo (Moustafa et al., 2013). Resultados demonstram que amígdala é uma estrutura chave que medeia a aquisição e a expressão do medo condicionado (LeDoux et al., 1988), o hipocampo tem uma papel importante para o processamento contextual e o vmPFC é importante para formar memórias de extinção do medo (Moustafa et al., 2013).

Essas áreas do sistema nervoso, principalmente CPFM e Hpc, central são acometidas pela neurotoxicidade decorrente da deposição da β A (Busche et al., 2012; Jin et al., 2011). Nestas estruturas acontecem processos neuroplásticos dependentes da atividade dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA (Acheson et al., 1995; Deogracias et al., 2004). (Deogracias et al., 2004; Leal et al., 2014). Esses fenômenos neuroplásticos no CPFM e Hpc estão diretamente envolvidos em processos de formação de memória (Brightwell et al., 2004;

Canto-de-Souza and Mattioli, 2016; Giustino and Maren, 2015; Impey et al., 1998; Martínez et al., 2014; Zoladz et al., 2012). Estudos demonstram que a deposição da β A modifica a cinética de liberação e captação do glutamato (Brito-Moreira et al., 2011; Pirttimäki et al., 2013; Talantova et al., 2013). Adicionalmente, a β A também é capaz de inibir a captação de glutamato pelos astrócitos através de sua interação com as proteínas transportadoras de aminoácidos destas células (Matos et al., 2008; Parpura-Gill et al., 1997). Em estudos de Chen e colaboradores (2017), foi demonstrado que duas semanas após a microinjeção A β Os, a microinjeção prejudicou o aprendizado e a memória semelhante aos nossos resultados no TRO e TLO, além de promover uma perda de sinapse e diminuição do LTP no hipocampo. Adicionalmente, Rammes e colaboradores em 2011 demonstraram que a aplicação da β A em cortes de neurônios hipocámpais de camundongos causa prejuízo da LTP e que esse efeito é dependente da ativação de receptores NMDA (Rammes et al., 2011a). Além disso, a ativação extra celular desses receptores podem contribuir para uma disfunção sináptica e morte neural (Song et al., 2008). Dessa forma, as alterações nos testes de memórias ocasionadas pela injeção intracerebroventricular do A β Os encontradas nesses estudos, podem ser devido a neurotoxicidade e modificações neuroplásticas nessas estruturas chaves na DA.

Como mencionado na introdução, a DA é caracterizada pela presença de β A, entretanto, a neuroinflamação é um fator importante que contribui para o comprometimento cognitivo e doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (Krause and Müller, 2010; Zhao et al., 2019). Nosso estudo demonstrou, que além das alterações cognitivas, a microinjeção do A β Os

promoveu um aumento das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α em regiões do CPFM e Hpc. Estudos anteriores demonstram que administração de A β Os ocasiona um aumento de IL-1 β , IL6 e TNF- α no hipocampo após 6h da injeção (Brkic et al., 2015). Além disso, camundongos com mutações genéticas que favorecem o acúmulo de β A também apresentam aumento das citocinas IL-1 β e TNF- α no hipocampo (Kim et al., 2019). No mesmo sentido, amostras de cérebro humano de DA desde estágios iniciais expressam citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Sudduth et al., 2013). Apesar da neuroinflamação encontrada no CPFM e Hpc, nós não observamos aumento do A β Os nas primeiras 4h, 24h ou 48h (Figura 14). No mesmo sentido, Faucher e colaboradores (2016), demonstraram que 7 dias após a microinjeção de A β Os no hipocampo ocorre uma diminuição da detecção desse oligômero, entretanto, encontra-se ativação dos astrócitos no hipocampo.

A inflamação no cérebro é caracterizada pela expressão de mediadores inflamatórios e ativação das células da glia, principalmente astrócitos e micróglia (Krause and Müller, 2010). No sistema nervoso central, as micróglias são os fagócitos residentes do sistema imunológico inato. Essas células são encontradas em um estado altamente ativado próximo de regiões anatômicas que possuem placas senis no cérebro da DA (Rogers and Shen, 2006). Nesse estado ativado, a micróglia produz várias citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores imunes que criam um ambiente neurotóxico que pode levar à progressão da doença (Akiyama, 2000). Vários estudos evidenciam um número aumentado de micróglia morfolologicamente reativa em cérebros com DA comparada para indivíduos que não possuem a DA (Cras et al., 1990; Styren et al., 1990). Adicionalmente a isso, Brkic e colaboradores (2015) demonstraram

que a microinjeção do A β Os promove um aumento da ativação da micróglia no CPFM e Hpc e essa alteração vem acompanhado de uma maior liberação nos níveis das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β , IL6 e TNF- α . Já em relação aos astrócitos, a β A aumenta a expressão do gene da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), responsável pela produção de prostaglandinas inflamatórias, bem como da enzima iNOS (Benito et al., 2012a), demonstrando dessa forma, a existência de um componente inflamatório associado à ação da β A nas células da glia.

Até o momento, diversos estudos indicam que a neurotoxicidade glutamatérgica e neuroinflamação podem contribuir para a DA (Akiyama, 2000; Aso et al., 2012b; Bedse et al., 2014b; Benito et al., 2012b; Cras et al., 1990; Krause and Müller, 2010; Rammes et al., 2011b). Interessantemente, a transmissão glutamatérgica e a neuroinflamação nas áreas afetadas pela DA pode ser fisiologicamente modulada por outros neurotransmissores, como os endocanabinóide (Auclair et al., 2000; Goonawardena et al., 2011; Piomelli, 2003). Os receptores CB1 parecerem ter um efeito neuroprotetor na DA (Aso et al., 2012b), já a ativação dos receptores CB2 na micróglia é capaz de diminuir a neuroinflamação, recuperar a plasticidade sináptica neuronal e melhorar a capacidade cognitiva em camundongos transgênicos APP/PS1 (Wu et al., 2017).

Além desses receptores, outro receptor caracterizado é o receptor TRPV1 (Zygmunt et al., 1999). Em nível sináptico foi demonstrado que, ao contrário dos receptores CB1, os receptores TRPV1 do Hpc aumentam a liberação de glutamato, através do aumento da permeabilidade da membrana ao cálcio (Eguchi et al., 2016). Sabe-se que um dos principais tratamentos da DA é a memantina, que é um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo

NMDA. Clinicamente, a memantina retarda a progressão dos sintomas da doença e constitui uma das estratégias terapêuticas disponíveis clinicamente para tratar a doença (Reisberg et al., 2003). Liu e colaboradores (2014), demonstrou que a memantina foi capaz de melhorar a performance de memória espacial além de aumentar a liberação de neurotrofinas no hipocampo de camundongos APP/PS1, que é um dos modelos animais da DA (Liu et al., 2014).

Em nosso estudo, nós observamos que o tratamento com SB366791, um antagonista dos receptores TRPV1, foi capaz de prevenir o efeitos deletérios sobre a memória de curto prazo e longo prazo no reconhecimento de objetos, na memória espacial, além de diminuir o prejuízo na consolidação da memória de extinção tanto no medo condicionado ao contexto, bem como no medo condicionado ao som. Esses resultados demonstram que SB366791 apresenta resultados muito similares a memantina. Adicionalmente, o tratamento com SB366791 diminuiu a liberação das citocinas TNF- α e IL-1 β que haviam aumentado com a microinjeção do A β Os. Posteriormente, para confirmar a participação dos receptores TRPV1, nós também utilizamos animais knockout TRPV1 e observamos resultados semelhantes ao tratamento com SB366791, tanto na memória episódica, quanto na memória de medo. Além disso, os animais knockout TRPV1 também apresentaram uma diminuição das citocinas TNF- α e IL-1 β (Figura 17).

Diferentemente dos nossos resultados, Chen e colaboradores (2017) demonstraram que a administração de capsaicina, um agonista de receptores TRPV1, melhora o aprendizado e a memória prejudicada pela microinjeção de A β Os. Adicionalmente, Jayant e colaboradores em 2016 mostraram que a administração repetida de um agonista TRPV1 por gavagem melhorou a

atividade cognitiva de camundongos submetidos a um modelo da DA, avaliados no labirinto aquático de Morris (Jayant et al., 2016b). Esse dado parece contraditório aos nossos resultados. Entretanto, neste trabalho, como modelo da DA, foi realizada a injeção intracerebroventricular de estreptozotocina, que é um agente alquilante, capaz de induzir lesões no DNA dos neurônios, desencadeando mecanismos de apoptose (Reusser, 1971), sendo utilizado como um modelo da forma esporádica da doença (Salkovic-Petrisic et al., 2013) e não no processo neurodegenerativo subjacente à forma familiar da DA. Contudo, em um trabalho publicado recentemente, foi demonstrado que animais knockout TRPV1 recupera o prejuízo de memória e reduz o A β em um modelo transgênico da doença de Alzheimer (J. Kim et al., 2019), dados esses que são consistentes com o nosso trabalho.

Como citado anteriormente, os receptores TRPV1 aumentam a liberação de glutamato através do aumento da permeabilidade da membrana ao cálcio (Eguchi et al., 2016). Além disso, diversos estudos demonstram que estes receptores estão expressos na micróglia, nos astrócitos e neurônios (Bari et al., 2011; Doly et al., 2004; Szallasi et al., 2007). Embora não tenha sido encontradas alterações nos níveis de células Iba-1 positivas e NeuN positivas no nosso estudo, Kim e colaboradores (2005) demonstraram que a exposição de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos ao agonista de TRPV1 (capsaicina) desencadeou morte celular e que esse efeito foi inibido pelos antagonistas do TRPV1, capsazepina (Kim, 2005). Adicionalmente a isso, Benito e colaboradores em 2012 observaram que o bloqueio dos receptores TRPV1 em cultura de astrócitos preveniu o aumento da expressão do gene das enzimas COX-2, iNOS e do TNF- α (Benito et al., 2012a).

Um outro dado importante encontrado no trabalho que corroboram com os resultados encontrados e os citados acima, foi confirmação da expressão dos receptores TRPV1 em neurônios e micróglia no córtex de pacientes. Adicionalmente a isso, encontramos uma possível diminuição dos marcadores de neurônios que foram incubados com AβOs, um aumento de TNF-α e um possível efeito benéfico do tratamento com o antagonista dos receptores TRPV1 nas duas condições. Resultados citados anteriormente já demonstraram que pacientes com Alzheimer apresentam uma acentuada morte de neurônios, neuroinflamação e aumento de micróglia altamente reativas. Levando em consideração que esses receptores TRPV1 podem promover uma neurotoxicidade glutamatérgica, estão expressos em micróglia e astrócitos que são células altamente ativadas em pacientes com DA e apresentam um papel importante na neuroinflamação, é provável que os canais TRPV1 contribuam para o prejuízo da plasticidade sináptica, formação de memória e processos neuroinflamatórios relacionados à DA e que o antagonismo desses receptores apresente um efeito neuroprotetor frente essas alterações, podendo ser explorado como um possível tratamento para DA.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que o antagonismo do receptor TRPV1 apresenta um efeito neuroprotetor, diminuindo o déficit cognitivo. Além disso, o SB366791 foi capaz de diminuir as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α no CPFM e Hpc de animais submetidos ao modelo da DA induzido por A β Os, sugerindo que o canal iônico TRPV1 pode ser um potencial alvo para o estudo e tratamento da doença de Alzheimer.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2009;12:1567–76. <https://doi.org/10.1038/nn.2433>.
- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, et al. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 1995;374:450–3. <https://doi.org/10.1038/374450a0>.
- Akiyama H. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21:383–421. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00124-X).
- Alzheimer Disease International. World Alzheimer Rep 2015 Glob Impact Dement Anal Preval Incid Cost Trends 2015:87.
- Alzheimer's Association. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 2014;10:e47-92.
- Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. *World Alzheimer Rep 2019 Attitudes Dement* 2019:160.
- Andrew E. Budson, Paul R. Solomon. Perda da Memória, Doença de Alzheimer e Demência. IPublishcentral 2017. <https://www.evolution.com.br/epubreader/9788535266399> (accessed October 7, 2018).
- Aso E, Palomer E, Juvés S, Maldonado R, Muñoz FJ, Ferrer I. CB1 agonist ACEA protects neurons and reduces the cognitive impairment of A β PP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis JAD* 2012a;30:439–59. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111862>.
- Aso E, Palomer E, Juvés S, Maldonado R, Muñoz FJ, Ferrer I. CB1 agonist ACEA protects neurons and reduces the cognitive impairment of A β PP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis JAD* 2012b;30:439–59. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111862>.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F. Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2000;83:3287–93.
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F. Retrieval and reconsolidation of object recognition memory are independent processes in the perirhinal cortex. *Neuroscience* 2013;253:398–405. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.001>.
- Bannazadeh M, Fatehi F, Fatemi I, Roohbakhsh A, Allahtavakoli M, Nasiri M, et al. The role of transient receptor potential vanilloid type 1 in unimodal and multimodal object recognition task in rats. *Pharmacol Rep PR* 2017;69:526–31. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.01.025>.

Bari M, Bonifacino T, Milanese M, Spagnuolo P, Zappettini S, Battista N, et al. The endocannabinoid system in rat gliosomes and its role in the modulation of glutamate release. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:833–45. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0494-4>.

Bedse G, Romano A, Cianci S, Lavecchia AM, Lorenzo P, Elphick MR, et al. Altered expression of the CB1 cannabinoid receptor in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 2014a;40:701–12. <https://doi.org/10.3233/JAD-131910>.

Bedse G, Romano A, Cianci S, Lavecchia AM, Lorenzo P, Elphick MR, et al. Altered expression of the CB1 cannabinoid receptor in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 2014b;40:701–12. <https://doi.org/10.3233/JAD-131910>.

Bedse G, Romano A, Lavecchia AM, Cassano T, Gaetani S. The Role of Endocannabinoid Signaling in the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2014c;43:1115–36. <https://doi.org/10.3233/JAD-141635>.

Benito C, Tolón RM, Castillo AI, Ruiz-Valdepeñas L, Martínez-Orgado JA, Fernández-Sánchez FJ, et al. β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors. *Br J Pharmacol* 2012a;166:1474–89. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01889.x>.

Benito C, Tolón RM, Castillo AI, Ruiz-Valdepeñas L, Martínez-Orgado JA, Fernández-Sánchez FJ, et al. β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors. *Br J Pharmacol* 2012b;166:1474–89. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01889.x>.

Bisaz R, Travaglia A, Alberini CM. The Neurobiological Bases of Memory Formation: From Physiological Conditions to Psychopathology. *Psychopathology* 2014;47:347–56. <https://doi.org/10.1159/000363702>.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31–9. <https://doi.org/10.1038/361031a0>.

Bonardi C, de Pulford F, Jennings D, Pardon M-C. A detailed analysis of the early context extinction deficits seen in APPswe/PS1dE9 female mice and their relevance to preclinical Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2011;222:89–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.041>.

Brightwell JJ, Gallagher M, Colombo PJ. Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments. *Neurobiol Learn Mem* 2004;81:19–26.

Brito-Moreira J, Paula-Lima AC, Bomfim TR, Oliveira FB, Sepúlveda FJ, De Mello FG, et al. A β oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. *Curr Alzheimer Res* 2011;8:552–62.

Brkic M, Balusu S, Van Wonterghem E, Gorle N, Benilova I, Kremer A, et al. Amyloid Oligomers Disrupt Blood-CSF Barrier Integrity by Activating Matrix Metalloproteinases. *J Neurosci* 2015;35:12766–78. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0006-15.2015>.

Busche MA, Chen X, Henning HA, Reichwald J, Staufenbiel M, Sakmann B, et al. Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:8740–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206171109>.

Canter RG, Penney J, Tsai L-H. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature* 2016;539:187–96. <https://doi.org/10.1038/nature20412>.

Canto-de-Souza L, Mattioli R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 2016;130:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.012>.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997a;389:816–24. <https://doi.org/10.1038/39807>.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997b;389:816–24. <https://doi.org/10.1038/39807>.

Chen L, Huang Z, Du Y, Fu M, Han H, Wang Y, et al. Capsaicin Attenuates Amyloid- β -Induced Synapse Loss and Cognitive Impairments in Mice. *J Alzheimers Dis JAD* 2017;59:683–94. <https://doi.org/10.3233/JAD-170337>.

Chromy BA, Nowak RJ, Lambert MP, Viola KL, Chang L, Velasco PT, et al. Self-Assembly of A β 1 - 42 into Globular Neurotoxins [†]. *Biochemistry* 2003;42:12749–60. <https://doi.org/10.1021/bi030029q>.

Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small G, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921–3. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>.

Cras P, Kawai M, Siedlak S, Mulvihill P, Gambetti P, Lowery D, et al. Neuronal and microglial involvement in beta-amyloid protein deposition in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1990;137:241–6.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000;405:183–7. <https://doi.org/10.1038/35012076>.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998;391:387–90. <https://doi.org/10.1038/34910>.

Decurtis M, Pare D. The rhinal cortices: a wall of inhibition between the neocortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol* 2004;74:101–10. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.08.005>.

Deogracias R, Espliguero G, Iglesias T, Rodríguez-Peña A. Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci* 2004;26:470–80. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.03.007>.

Devan BD, Goad EH, Petri HL. Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem* 1996;66:305–23. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0072>.

Doly S, Fischer J, Salio C, Conrath M. The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. *Neurosci Lett* 2004;357:123–6. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.051>.

Eguchi N, Hishimoto A, Sora I, Mori M. Slow synaptic transmission mediated by TRPV1 channels in CA3 interneurons of the hippocampus. *Neurosci Lett* 2016;616:170–6. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.065>.

Faucher P, Mons N, Micheau J, Louis C, Beracochea DJ. Hippocampal Injections of Oligomeric Amyloid β -peptide (1–42) Induce Selective Working Memory Deficits and Long-lasting Alterations of ERK Signaling Pathway. *Front Aging Neurosci* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00245>.

Fietta Pierluigi, Fietta Pieranna. The neurobiology of the human memory. *Theor Biol Forum* 2011;104:69–87.

Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, Ribeiro FC, Costa CV, Melo HM, et al. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight $\alpha\beta$ oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2013;33:9626–34. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0482-13.2013>.

Floden AM, Li S, Combs CK. Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2005;25:2566–75. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4998-04.2005>.

Giustino TF, Maren S. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front Behav Neurosci* 2015;9:298. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298>.

Goonawardena AV, Riedel G, Hampson RE. Cannabinoids alter spontaneous firing, bursting, and cell synchrony of hippocampal principal cells. *Hippocampus* 2011;21:520–31. <https://doi.org/10.1002/hipo.20769>.

Groc L, Bard L, Choquet D. Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 2009;158:4–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.029>.

Hamel E. Cerebral circulation: function and dysfunction in Alzheimer's disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;65:317–24. <https://doi.org/10.1097/FJC.000000000000177>.

Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 2002;5:405–14. <https://doi.org/10.1038/nn835>.

Hippius H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2003;5:101–8.

Honjo K, Black SE, Verhoeff NPLG. Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and the β -amyloid cascade. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol* 2012;39:712–28.

Huang, W. X., F. Yu, R. M. Sanchez, Y. Q. Liu, J. W. Min, J. J. Hu, N. B. Bsoul, S. Han, J. Yin, W. H. Liu, X. H. He and B. W. Peng (2015). "TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain." *Brain Behav Immun* **48**: 68–77.

Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, Storm DR. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci* 1998;1:595–601. <https://doi.org/10.1038/2830>.

Jayant S, Sharma BM, Bansal R, Sharma B. Pharmacological benefits of selective modulation of cannabinoid receptor type 2 (CB2) in experimental Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 2016a;140:39–50. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.11.006>.

Jayant S, Sharma BM, Sharma B. Protective effect of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) modulator, against behavioral, biochemical and structural damage in experimental models of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2016b;1642:397–408. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.022>.

Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5819–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017033108>.

Kim J, Lee S, Kim Jaekyoon, Ham S, Park JHY, Han S, et al. Ca²⁺-permeable TRPV1 pain receptor knockout rescues memory deficits and reduces amyloid- β and tau in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2019;ddz276. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz276>.

Kim N, Do J, Ju IG, Jeon SH, Lee JK, Oh MS. Picrorhiza kurroa Prevents Memory Deficits by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and BACE1 Expression in 5xFAD Mice. *Neurotherapeutics* 2019. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00792-7>.

Kim SR. Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Mediates Cell Death of Mesencephalic Dopaminergic Neurons In Vivo and In Vitro. *J Neurosci* 2005;25:662–71. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4166-04.2005>.

Kong, W., X. Wang, X. Yang, W. Huang, S. Han, J. Yin, W. Liu, X. He and B. Peng (2019). "Activation of TRPV1 Contributes to Recurrent Febrile Seizures via Inhibiting the Microglial M2 Phenotype in the Immature Brain." *Front Cell Neurosci* **13**: 442.

Korte M, Kang H, Bonhoeffer T, Schuman E. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 1998;37:553–9.

Krause DL, Müller N. Neuroinflammation, Microglia and Implications for Anti-Inflammatory Treatment in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010;2010:1–9. <https://doi.org/10.4061/2010/732806>.

Kumar A, Singh A, Ekavali null. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep PR* 2015;67:195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>.

Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 2014;76 Pt C:639–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>.

LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1988;8:2517–29.

Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1995;15:1835–53.

Liu MY, Wang S, Yao WF, Zhang ZJ, Zhong X, Sha L, et al. Memantine improves spatial learning and memory impairments by regulating NGF signaling in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience* 2014;273:141–51. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.011>.

Liu P-P, Xie Y, Meng X-Y, Kang J-S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther* 2019;4:29. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>.

Lourenco MV, Frozza RL, de Freitas GB, Zhang H, Kincheski GC, Ribeiro FC, et al. Exercise-linked FND5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. *Nat Med* 2019;25:165–75. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0275-4>.

Ma S-X, Kwon S-H, Seo J-Y, Hwang J-Y, Hong S-I, Kim H-C, et al. Impairment of opiate-mediated behaviors by the selective TRPV1 antagonist SB366791. *Addict Biol* 2016. <https://doi.org/10.1111/adb.12460>.

Maren S. Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron* 2011;70:830–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.023>.

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 2003;302:84–8. <https://doi.org/10.1126/science.1088208>.

Martínez MC, Villar ME, Ballarini F, Viola H. Retroactive interference of object-in-context long-term memory: role of dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Hippocampus* 2014;24:1482–92. <https://doi.org/10.1002/hipo.22328>.

Matos M, Augusto E, Oliveira CR, Agostinho P. Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience* 2008;156:898–910. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.022>.

Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:3655–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3655>.

Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:850–60. <https://doi.org/10.1038/nrn2738>.

Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 2002;36:121–37.

Mori MA, Meyer E, Soares LM, Milani H, Guimarães FS, de Oliveira RMW. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017;75:94–105. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.11.005>.

Morris JC, Roe CM, Xiong C, Fagan AM, Goate AM, Holtzman DM, et al. *APOE* predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol* 2010;67:122–31. <https://doi.org/10.1002/ana.21843>.

Moustafa AA, Gilbertson MW, Orr SP, Herzallah MM, Servatius RJ, Myers CE. A model of amygdala–hippocampal–prefrontal interaction in fear conditioning and extinction in animals. *Brain Cogn* 2013;81:29–43. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2012.10.005>.

Nerandzic V, Mrozkova P, Adamek P, Spicarova D, Nagy I, Palecek J. Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine. *Br J Pharmacol* 2017. <https://doi.org/10.1111/bph.13849>.

Nicole O, Hadzibegovic S, Gajda J, Bontempi B, Bem T, Meyrand P. Soluble amyloid beta oligomers block the learning-induced increase in hippocampal sharp wave-ripple rate and impair spatial memory formation. *Sci Rep* 2016;6:22728. <https://doi.org/10.1038/srep22728>.

Palop JJ, Chin J, Mucke L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443:768–73. <https://doi.org/10.1038/nature05289>.

Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 2010;13:812–8. <https://doi.org/10.1038/nn.2583>.

Parpura-Gill A, Beitz D, Uemura E. The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. *Brain Res* 1997;754:65–71.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:873–84. <https://doi.org/10.1038/nrn1247>.

Pirttimäki TM, Codadu NK, Awni A, Pratik P, Nagel DA, Hill EJ, et al. $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. *PloS One* 2013;8:e81828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081828>.

Rammes G, Hasenjäger A, Sroka-Saidi K, Deussing JM, Parsons CG. Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of β -amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology* 2011a;60:982–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.051>.

Rammes G, Hasenjäger A, Sroka-Saidi K, Deussing JM, Parsons CG. Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of β -amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology* 2011b;60:982–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.051>.

Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ, et al. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2003;348:1333–41. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013128>.

Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2014;88:640–51. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>.

Reusser F. Mode of action of streptozotocin. *J Bacteriol* 1971;105:580–8.

Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Merlos M, Garzón-Niño J. Endocannabinoid control of glutamate NMDA receptors: the therapeutic potential and consequences of dysfunction. *Oncotarget* 2016;7:55840–62. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10095>.

Rogers J, Shen Y. A Perspective on Inflammation in Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 2006;924:132–5. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05571.x>.

Rosas-Vidal LE, Do-Monte FH, Sotres-Bayon F, Quirk GJ. Hippocampal-prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacol Off Publ*

Am Coll Neuropsychopharmacol 2014;39:2161–9.
<https://doi.org/10.1038/npp.2014.64>.

Rudy CC, Hunsberger HC, Weitzner DS, Reed MN. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Aging Dis* 2015a;6:131–48. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0423>.

Rudy CC, Hunsberger HC, Weitzner DS, Reed MN. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Aging Dis* 2015b;6:131–48. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0423>.

Sadigh-Eteghad S, Mahmoudi J, Babri S, Talebi M. Effect of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor activation on beta-amyloid induced recognition memory impairment. Possible role of neurovascular function. *Acta Cir Bras* 2015;30:736–42. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150110000003>.

Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 2011;472:466–70. <https://doi.org/10.1038/nature09817>.

Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996 2013;120:233–52. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>.

Song MS, Rauw G, Baker GB, Kar S. Memantine protects rat cortical cultured neurons against beta-amyloid-induced toxicity by attenuating tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 2008;28:1989–2002. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06498.x>.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:1977–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1977>.

Styren SD, Civin WH, Rogers J. Molecular, cellular, and pathologic characterization of HLA-DR immunoreactivity in normal elderly and Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol* 1990;110:93–104. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(90\)90054-v](https://doi.org/10.1016/0014-4886(90)90054-v).

Sudduth TL, Schmitt FA, Nelson PT, Wilcock DM. Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2013;34:1051–9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.012>.

Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:357–72. <https://doi.org/10.1038/nrd2280>.

Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, et al. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E2518–2527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306832110>.

Taylor CJ, Ohline SM, Moss T, Ulrich K, Abraham WC. The persistence of long-term potentiation in the projection from ventral hippocampus to medial prefrontal cortex in awake rats. *Eur J Neurosci* 2016;43:811–22. <https://doi.org/10.1111/ejn.13167>.

Tóth A, Boczán J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;135:162–8. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.003>.

VanElzakker MB, Dahlgren MK, Davis FC, Dubois S, Shin LM. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiol Learn Mem* 2014;113:3–18. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.11.014>.

Vaucher E, Fluit P, Chishti MA, Westaway D, Mount HTJ, Kar S. Object recognition memory and cholinergic parameters in mice expressing human presenilin 1 transgenes. *Exp Neurol* 2002;175:398–406. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7915>.

Wang SE, Ko SY, Jo S, Choi M, Lee Seung Hoon, Jo H-R, et al. TRPV1 Regulates Stress Responses through HDAC2. *Cell Rep* 2017;19:401–12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.050>.

Warburton EC, Brown MW. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 2010;48:2262–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.12.022>.

Wichert S, Wolf OT, Schwabe L. Changing memories after reactivation: A one-time opportunity? *Neurobiol Learn Mem* 2013;99:38–49. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.11.001>.

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:1055–70. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.004>.

Wu J, Hocevar M, Foss JF, Bie B, Naguib M. Activation of CB2 receptor system restores cognitive capacity and hippocampal Sox2 expression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2017;811:12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.044>.

Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 2006;12:1005–15. <https://doi.org/10.1038/nm1484>.

Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:958–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.03.006>.

Yang HD, Kim DH, Lee SB, Young LD. History of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocognitive Disord* 2016;15:115–21. <https://doi.org/10.12779/dnd.2016.15.4.115>.

Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep* 2019;9:5790. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8>.

Zoladz PR, Park CR, Halonen JD, Salim S, Alzoubi KH, Srivareerat M, et al. Differential expression of molecular markers of synaptic plasticity in the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala in response to spatial learning, predator exposure, and stress-induced amnesia. *Hippocampus* 2012;22:577–89. <https://doi.org/10.1002/hipo.20922>.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørsgård M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999;400:452–7. <https://doi.org/10.1038/22761>.

ANEXOS

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PARECER

A Pós-Graduanda Egidi Mayara Firmino Silva apresenta sua Tese de Doutorado intitulada “*Efeitos neuroprotetores do antagonismo dos receptores TRPV1 em um modelo animal da doença de Alzheimer*”.

No presente estudo, a doutoranda analisou a hipótese de que os receptores TRPV1 apresentam efeitos neuroprotetores, diminuindo o déficit cognitivo e a neuro-inflamação no modelo da doença de Alzheimer induzido pela microinjeção do oligômero de abeta amiloide (ABO's).

Sou de parecer favorável à submissão da Tese de Doutorado à Comissão de Pós-Graduação para que o trabalho seja encaminhado para análise pelos membros da banca examinadora.

Ribeirão Preto, 15 de Novembro de 2019.

Professor Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes
Departamento Farmacologia
FMRP-USP