

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITO DA MINOCICLINA SOBRE A MICRÓGLIA DO
***LOCUS COERULEUS* EM UM MODELO ESPORÁDICO PARA**
DOENÇA DE ALZHEIMER

Jaboticabal – SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA MINOCICLINA SOBRE A MICRÓGLIA DO *LOCUS COERULEUS* EM UM
MODELO ESPORÁDICO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER**

JULIA DE LIMA PANEGHINI

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão
Co-orientadora: Dra. Mariane C. Vicente

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
– UNESP Jaboticabal, para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal – SP
1º semestre/2022

P191e Paneghini, Julia
Efeito da minociclina sobre a micróglia do locus coeruleus em um modelo esporádico para doença de alzheimer / Julia Paneghini. -- Jaboticabal, 2022
51 p. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Luciane Helena Gargaglioni
Coorientadora: Mariane Cristina Vicente

1. Neurofisiologia. 2. Microglia. 3. Sistema nervoso Degeneração. 4.
Alzheimer, Doença de Pacientes. I. Título.

DEPARTAMENTO:

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

EFEITO DA MINOCICLINA SOBRE A MICROGLIA DO LOCUS COERULEUS
TÍTULO: EM UM MODELO ESPORÁDICO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

ACADÊMICO: Júlia de Lima Paneghini

CURSO: Ciências Biológicas

ORIENTADOR (ES): Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

COORIENTADORA: Mariane Cristine Vicente

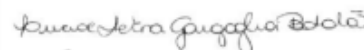
Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

(Nomes)

(Assinaturas)

Presidente Luciane H. Gargaglioni Batalhão



Membro Luana Tenório Lopes

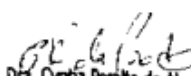


Membro Lucas Gomes de Souza



Jaboticabal 04 / 03 / 2022

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 09 / 03 / 2022



Prof. Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado
Chefe do Depto. de Morfologia e
Fisiologia Animal

Em um estado sombrio nós nos encontramos...
um pouco mais de conhecimento
iluminar nosso caminho pode.
– **Mestre Yoda.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando ao longo de toda a minha trajetória e sempre presentes na minha vida. Agradeço o tempo, amor, compreensão e esforços dedicados a minha formação pessoal e profissional, e por sempre me apoiarem na busca dos meus sonhos.

À Profa Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa, pela orientação, confiança, dedicação e competência na realização desse projeto.

A Mariane/Baiana, que me coorientou, ajudou, aconselhou, e foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço a paciência e a oportunidade dos ensinamentos que serão importantes para a construção da minha trajetória profissional e por ter contribuído para a minha formação científica.

À república CP que me acolheu desde o primeiro ano de faculdade e foi como uma segunda família para mim, aos meus amigos da Biologia 016 por todos os momentos compartilhados e aos meus companheiros de laboratório pelas risadas e ajuda.

A todos os meus professores do curso de Ciências Biológicas da Unesp Jaboticabal pelo conhecimento que me foi passado ao longo desses 5 anos.

Ao Euclides, funcionário do Biotério de Mamíferos do Departamento de Fisiologia por toda a assistência oferecida com os animais nesse período.

Meu agradecimento em especial aos ratos que foram utilizados para a execução deste estudo, e que contribuíram com suas vidas para a realização deste trabalho. Sem eles este trabalho não seria possível de ser realizado.

As agências financiadoras FAPESP, CNPq e CAPES, por terem colaborado financeiramente para a realização dessa pesquisa.

SUMÁRIO

1. RESUMO	9
2. ABSTRACT	10
3. INTRODUÇÃO	11
4. OBJETIVO.....	18
5. REVISÃO DE LITERATURA	18
5.1 Estatísticas da Doença de Alzheimer.....	18
5.2 Locus coeruleus e a DA.....	19
5.3 Micróglia e Neuroinflamação da DA	20
5.4 Minociclina	22
6. MATERIAL E MÉTODOS	23
6.1 - Animais	24
6.2 - Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ).....	24
6.3 - Tratamento com minociclina.....	25
6.4 - Teste comportamental para validação do modelo	26
6.5 – Imuno-histoquímica	27
6.6 - Efeito do tratamento de minociclina nas células da micróglia na DAE .	28
6.6.1 Densidade celular.....	28
6.6.2 Número de células e cálculo da densidade celular	29
6.6.3 Morfologia das células de Micróglia	30
6.6.4 Distância vizinha mais próxima (NND)	30
6.7. Análise Estatística.....	31

7. RESULTADOS.....	31
7.1 - Efeitos da minociclina na aprendizagem e na memória espacial (Teste de Barnes).....	31
7.2 - Efeitos da minociclina nas células da micróglia na região do Locus coeruleus.....	33
8. DISCUSSÃO.....	36
8.1- Efeito da administração de minociclina na aprendizagem e na memória espacial	36
9. CONCLUSÃO	38
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a demência neurodegenerativa mais comum no mundo. A inflamação do sistema nervoso central na DA é o resultado da ativação das células da micróglia em resposta à formação de placas amilóides e / ou hiperfosforilação da proteína tau (NTFs), que pode promover um estado crônico de neuroinflamação que piora e acelera a progressão da doença. Em estudo anterior do nosso laboratório, demonstramos o aumento da expressão do peptídeo beta amiloide no *Locus Coeruleus* (LC) em um modelo de DA esporádico induzido por injeção intracerebroventricular de 2 mg / kg de estreptozotocina (STZ). O LC é uma região que pode desencadear o processo neuroinflamatório inicial na DA. Assim, no presente estudo, investigamos se o tratamento com minociclina (inibidor da micróglia) afeta as células da micróglia no LC em ratos tratados com STZ. Os ratos Wistar do grupo Placebo ou STZ foram tratados por 5 dias consecutivos com minociclina (30 mg/kg, ip) ou veículo (salina + água). Após os 5 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste comportamental de Barnes Maze e foi realizada a imuno-histoquímica para micróglia do LC por meio da marcação com Iba-1. Em relação ao teste de Barnes, não observamos diferença significativa no número de acertos no furo alvo entre os animais do grupo Veículo, tratados com Placebo ou Minociclina (Veículo-Placebo: $6,6 \pm 2,9$ vs Veículo-Minociclina: $6,4 \pm 3,1$; $p > 0,05$). Os animais STZ apresentaram menos acertos no furo alvo que seus respectivos veículos ($p < 0,05$). Observamos que o grupo STZ-Minociclina apresentou um número maior de acertos no furo alvo que o grupo STZ-Placebo (STZ-Mino: $3,8 \pm 2,9$ vs STZ-Placebo: $2,2 \pm 1,1$; $p < 0,05$). Em relação à morfologia da micróglia, o tratamento com minociclina diminuiu a densidade celular da micróglia no modelo AD ($p < 0,05$) e o tratamento não alterou a proximidade das células da micróglia no modelo STZ ($p > 0,05$). Da mesma forma, após o tratamento com minociclina, a arborização das células do grupo STZ-AD aumentou ($p < 0,05$) e o corpo celular diminuiu ($p < 0,05$), indicando o retorno da micróglia à sua forma reativa. Observamos também uma diminuição do índice morfológico ($p < 0,05$), que reflete a inativação das células da micróglia no modelo de DA. Nossos dados sugerem que a minociclina reduziu o comprometimento cognitivo, que possivelmente está associado à inibição da micróglia LC.

2. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative dementia in the world. Inflammation of the central nervous system in AD is the result of the activation of microglia cells in response to the formation of amyloid plaques and / or hyperphosphorylation of the tau protein (NFTs), which can promote a chronic state of neuroinflammation that worsens and accelerates the progression of disease. In our previous study, we demonstrated the increased expression of beta amyloid peptide in the Locus Coeruleus (LC) in a sporadic AD model induced by intracerebroventricular injection of 2 mg / kg of streptozotocin (STZ). LC is a region that can trigger the initial neuroinflammatory process in AD. Thus, we investigated whether treatment with minocycline (microglia inhibitor) would affect microglia cells in the LC in rats treated with STZ. Control or STZ Wistar rats were treated for 5 consecutive days with minocycline (30 mg/kg, ip) or vehicle. After 5 days of treatment, the animals were submitted to the Barnes Maze behavioral test and immunohistochemistry was performed for LC microglia by labeling with Iba-1. Regarding the Barnes test, we did not observe a significant difference in the number of hits in the target hole between animals in the Vehicle group, treated with Placebo or Minocycline (Vehicle-Control: 6.6 ± 2.9 vs Vehicle-Minocycline: 6.4 ± 3.1 ; $P > 0.05$). The STZ animals had a lower number of hits in the target hole than their respective vehicles ($p < 0.05$). We observed that the STZ-Minocycline group had a higher number of hits in the target hole than the STZ-Control group (STZ-Mino: 3.8 ± 2.9 vs STZ-Placebo: 2.2 ± 1.1 ; $p < 0.05$). We observed that the treatment with minocycline decreased the microglia cell density in the AD model ($p < 0.05$) and the treatment did not alter the proximity of the microglia cells in the STZ model ($p > 0.05$). Likewise, after treatment with minocycline, the arborization of cells in the STZ-AD group increased ($p < 0.05$) and the cell body decreased ($p < 0.05$), indicating the return of the microglia to its reactive form. We also observed a decrease in the morphological index ($p < 0.05$), which reflects the inactivation of microglia cells in the AD model. Our data suggest that minocycline reduced cognitive impairment, which is possibly associated with inhibition of LC microglia.

3. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada por perda de memória e déficits cognitivos progressivos, afetando gravemente as atividades da vida diária de seres humanos (VILLEMAGNE et al., 2017). Entre os idosos, é a forma mais comum de demência, compreendendo de 60 a 80% de todos os casos (WIRZ et al., 2014). De acordo com a *Alzheimer's Disease International* (ADI), estima-se que mais de 48,6 milhões de pessoas foram afetadas pela DA no mundo e esse número dobra a cada 20 anos, onde são registrados 9,9 milhões de novos casos de demência a cada ano (ADI, 2015). A previsão é que o número de doentes com Alzheimer chegue a 74,7 milhões em 2030 e a 131,5 milhões em 2050 (*World Health Organization*, 2013; PRINCE et al., 2016). Os casos de DA podem ser classificados em função da idade: a DA de acometimento tardio ao redor de 60 anos de idade (95 % dos casos), ocorre de forma esporádica, e a DA de acometimento precoce (5% dos casos), de incidência ao redor de 40 anos que mostra recorrência familiar (HARMAN, 1996; KAR et al., 2004). Alois Alzheimer descreveu pela primeira vez a histopatologia da DA (ALZHEIMER, 1907), como a caracterização por atrofia cerebral, placas amilóides (depósitos extracelulares de agregados de peptídeo β -amiloide (β A)), emaranhados neurofibrilares (compostos principalmente de proteína tau) principais biomarcadores moleculares da DA (HARRIS, 2012; MINTER et al., 2016; SCHELTENS et al., 2016), além de perda de neurônios e sinapses (Figura 1). À medida que a doença evolui outras funções cognitivas deterioram, como a orientação geográfica, raciocínio lógico, complicações motoras, e o grau de lucidez (KAR et al., 2004, LINDEBOOM e WEINSTEIN, 2004).

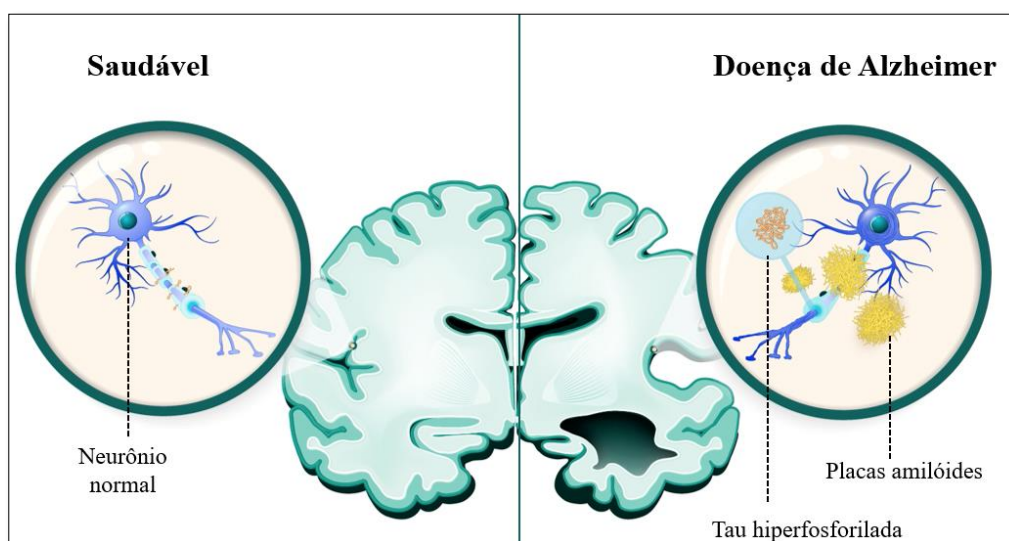


Figura 1. Diferença de um encéfalo saudável para um encéfalo com a Doença de Alzheimer, onde apresenta atrofia dos ventrículos, placas amilóides formadas por agregados de peptídeo β -amiloide (β A), e hiperfosforilação da proteína tau, formando emaranhados neurofibrilares. (Imagem adaptada de Shutterstock)

Estudos demonstraram que a neurodegeneração na DA inicia-se com a clivagem por enzimas secretases da proteína precursora amilóide (PPA), uma proteína transmembranar expressa em tecidos neuronais. Quando a PPA é clivada por α -secretase no meio do domínio β -amilóide (β A), não há a formação de oligômeros β A. Porém, quando PPA é clivada por enzimas β - e γ -secretases, resulta na produção, agregação e deposição do peptídeo beta-amilóide (β A1-42) os quais compõem as placas senis (figura 2A) (LASAGNA-REEVES et al., 2011; SERRANO-POZO et al., 2011; HEPPNER FL et al., 2015). A formação de β A, pode prejudicar a função sináptica nos neurônios, e simultaneamente desencadear uma resposta inflamatória local, pela ativação da micróglia que produz citocinas e quimiocinas inflamatórias. Ao longo do tempo, essas alterações bioquímicas e produção de citocinas subsequentes causadas pelo peptídeo β A levam à morte neuronal, atrofia cerebral e neurodegeneração, características típicas da DA. (HEPPNER FL et al., 2015).

Outra característica importante encontrada na DA é a presença de emaranhados neurofibrilares (NTFs), que é considerada fundamental para o desenvolvimento da DA, e sua concentração e distribuição têm sido consistentemente relacionadas com a gravidade da demência (MCKEE AC et al., 1991).

Sabe-se que os emaranhados neurofibrilares são predominantemente formados por acumulações de pares de filamentos espiralados (PFE), e que a proteína associada aos microtúbulos — *tau* — é um de seus componentes fundamentais (LEE VMY et al., 1991). A *tau* é uma proteína que promove a polimerização de tubulina *in vitro* e agregação de microtúbulos *in vivo* (GOEDERT et al., 1991). A *tau* associada aos PFE é anormalmente fosforilada (LEE VMY et al., 1991). Nesse contexto, existem evidências sugerindo que a *tau* fosforilada é menos capaz de polimerizar tubulina, e, ao invés, agrega-se na forma de PFE (figura 2B) (RUBEN GC et al., 1991), o que a torna altamente insolúvel (LOVESTONE S et al., 1992). Como consequência, ocorre uma ruptura do citoesqueleto celular que leva a diminuição da densidade sináptica, perda de sinapses, falência de neurotransmissores e, o desenvolvimento de um quadro neuroinflamatório que potencializa à neurodegeneração generalizada (Figura 2B) (HARRIS, 2012; MINTER et al., 2016; SCHELTENS et al., 2016)

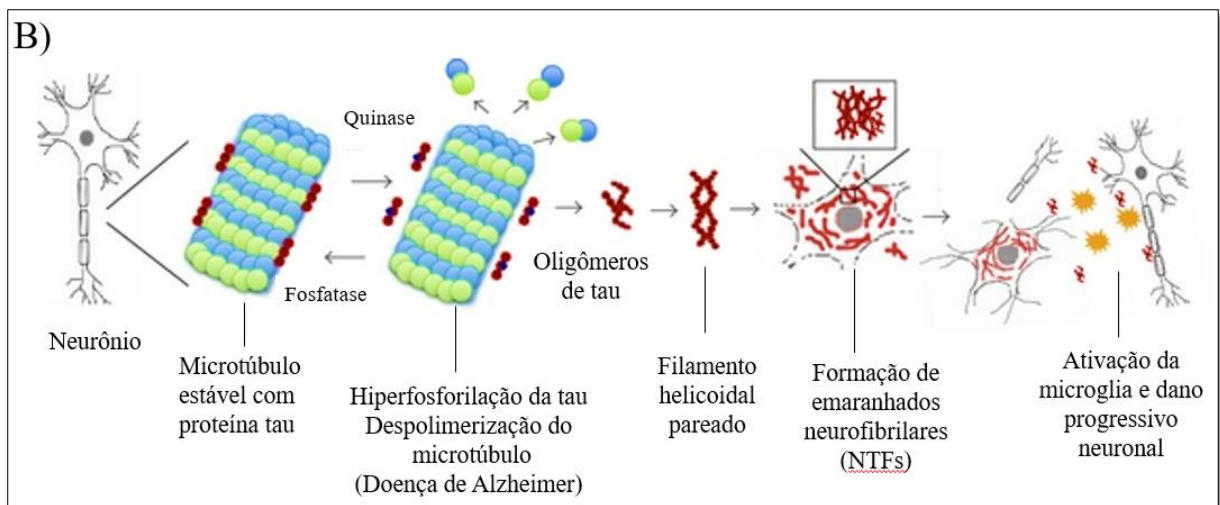
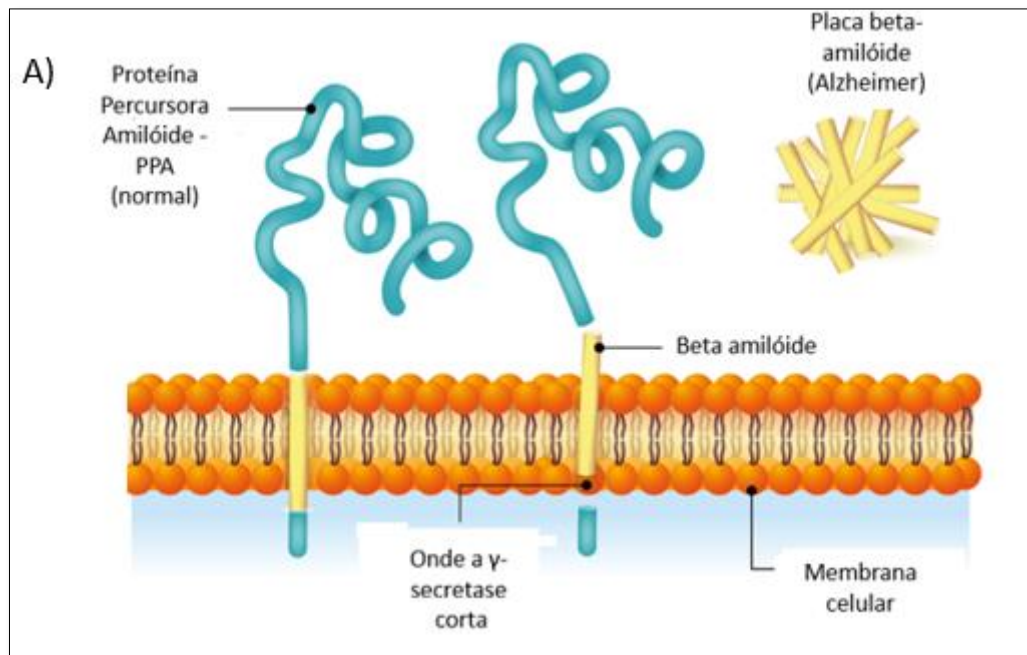


Figura 2. A) Formação do peptídeo β A (adaptado de Designua) . B) Como ocorre a hiperfosforilação da proteína tau, que consequentemente desencadeia a formação de emaranhados neurofibrilares e a ativação glial, causando danos neurais. (adaptado de Mokhtar et al, 2013)

A neuroinflamação desempenha um papel importante na cascata de eventos moleculares no encéfalo subjacente à DA. (MINTER et al., 2016; BUDN et al., 2016 HENEKA et e O'BANION, 2017; KAUR et al., 2019). A inflamação do SNC na DA é resultado da ativação das células da micróglia em resposta a formação das placas amilóides (ou acúmulo extracelular do peptídeo β A1-42) e/ou da hiperfosforilação da proteína tau (NFTs) promovendo

um estado crônico de neuroinflamação que piora e acelera a progressão da doença (SCHWAB e MCGEER, 2008; HALLIDAY et al., 2000; MINTER et al., 2016; DHEEN et al., 2007).

As micróglia são os macrófagos residentes no SNC. São células neuroimunes que estão em contato com astrócitos e neurônios (NAKAGAWA e CHIBA, 2015). Os estágios de ativação microglial foram definidos com base nas características morfológicas, moleculares e funcionais, com a micróglia totalmente ativada apresentando-se como outros macrófagos (COLTON e WILCOCK (2010); DAVOUST et al. (2008); HANISCH e KETTENMANN (2007). Em condições fisiológicas, a micróglia passa a maior parte do tempo em um estado de “repouso” (Figura 3), com processos altamente móveis monitorando continuamente o microambiente circundante (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN et al., 2005). A morfologia da micróglia "em repouso" é caracterizada por um pequeno corpo celular com uma arborização bem espalhada, também chamada de micróglia ramificada. (BALDY et al., 2018; TREMBLAY et al., 2010; VERDONK et al., 2016; WAKE et al., 2013). A micróglia reduz a complexidade de sua forma retraindo suas ramificações, de modo que sejam reabsorvidos no corpo celular, estando este com uma área maior e caracterizando sua forma reativa (Figura 3). Nesse estado, a micróglia tem uma aparência “ameboide”; esta morfologia pode facilitar a proliferação e migração celular (HABIB E BEYER, 2015; LAWSON et al., 1990; MASGRAU et al., 2017). Este fenótipo celular reativo produz fatores pró-inflamatórios como citocinas, radicais livres e neurotoxinas, podendo estimular a deposição de proteínas no SNC e provocar disfunção do sistema imune (KRAFT e HARRY, 2011). Infecção, trauma, isquemia, doenças neurodegenerativas ou atividade neuronal alterada, ou seja, qualquer distúrbio ou perda da homeostase encefálica indicando perigo real ou potencial para o SNC, pode evocar mudanças rápidas e profundas na forma da célula microglial, expressão gênica e comportamento funcional que é definido como "ativação microglial". (BLACK, LIU e WAXMAN, 2009; COLTON e WILDOCK, 2010; DAVOUST et al. 2008; GRAEBER e STREIT 2010; HANISCH e KETTENMANN, 2007; KREUTZBERG, 1996; VIVIEN e BUISSON, 2000; VAN ROSSUM e HANISCH; 2004). Um acúmulo excessivo desses fatores causado por ativação crônica da micróglia também resulta em dano neuronal (DURSUN, 2015).

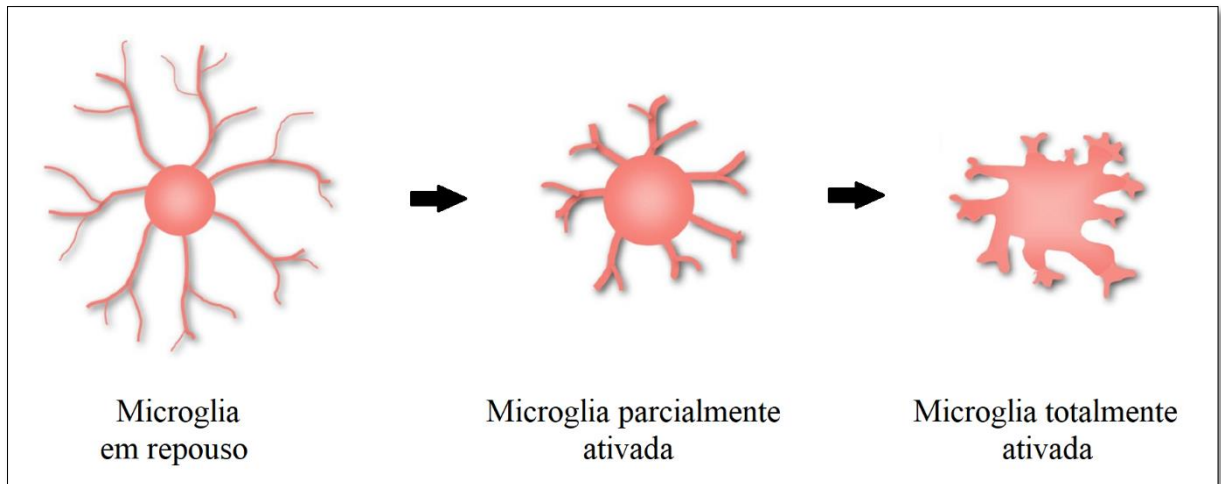


Figura 3. Imagem Adaptada de ScienceofParkinsons (<https://scienceofparkinsons.com/>)

A micróglia ativa uma resposta imune aguda no encéfalo contra estímulos prejudiciais, incluindo agregados de peptídeo β A. Notavelmente, em pacientes com DA, a placa senil β A é frequentemente encontrada em estreita proximidade com a micróglia reativa (PERLMUTTER et al., 1992; MCGEER et al., 1988). Embora seja esperado que essas placas possam ser eliminadas pela micróglia ativada (KG MAWUENYEGA et al., 2010), a evidência experimental até agora parece indicar o contrário.

STEWART et al., (2010) gerou linhagens de células micrógliais deficientes em CD36, TLR2, TLR4 e TLR6 para verificar se a sinalização via CD36-TLR4-TLR6 está envolvida na ativação da micróglia por β -amilóide. Foi verificado que a β A 1-42 induziu a secreção de óxido nítrico (NO) e ROS por células micrógliais do tipo selvagem, porém essas respostas inflamatórias foram anuladas na micróglia deficiente em CD36, TLR4 ou TLR6, mas não em TLR2. Esses achados fornecem evidências funcionais da importância do complexo de sinalização CD36-TLR4-TLR6 na regulação da resposta imune inata microglial a A β 1-42 (STEWART et al., 2010) que então abundantemente expressam fatores pró- inflamatórios, IL-1 β , TNF α , MIP-1 α e MCP-1 (NAGAI, A. et al, 2001). As citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por sua vez, estimulam a proteína PPA na deposição de mais peptídeos β A que novamente ativam mais micróglia, desenvolvendo-se um ciclo vicioso neurotóxico (Figura 4) (MINTER et al., 2016; GUERRIERO et al., 2016; SHAMIM e LASKOWSKI, 2017; BALDY et al., 2018; KAUR et al., 2019). Além disso, o óxido nítrico produzido a partir da micróglia ativada pode causar a nitração de 10Y do peptídeo β A, uma modificação que promove a formação da placa senil (KUMMER et al., 2011), e as citocinas liberadas aumentam a

neurodegeneração dos neurônios adjacentes que se somam ao processo inflamatório desencadeando um quadro de deterioração celular (LATTA CH et al., 2015, HENEKA et al., 2017). Por conseguinte, este ciclo neuroinflamatório deletério permanece vicioso e auto-suficiente desencadeando mais perda neuronal na DA (LATTA CH et al., 2015; HENEKA et al., 2015; MINTER et al., 2016).

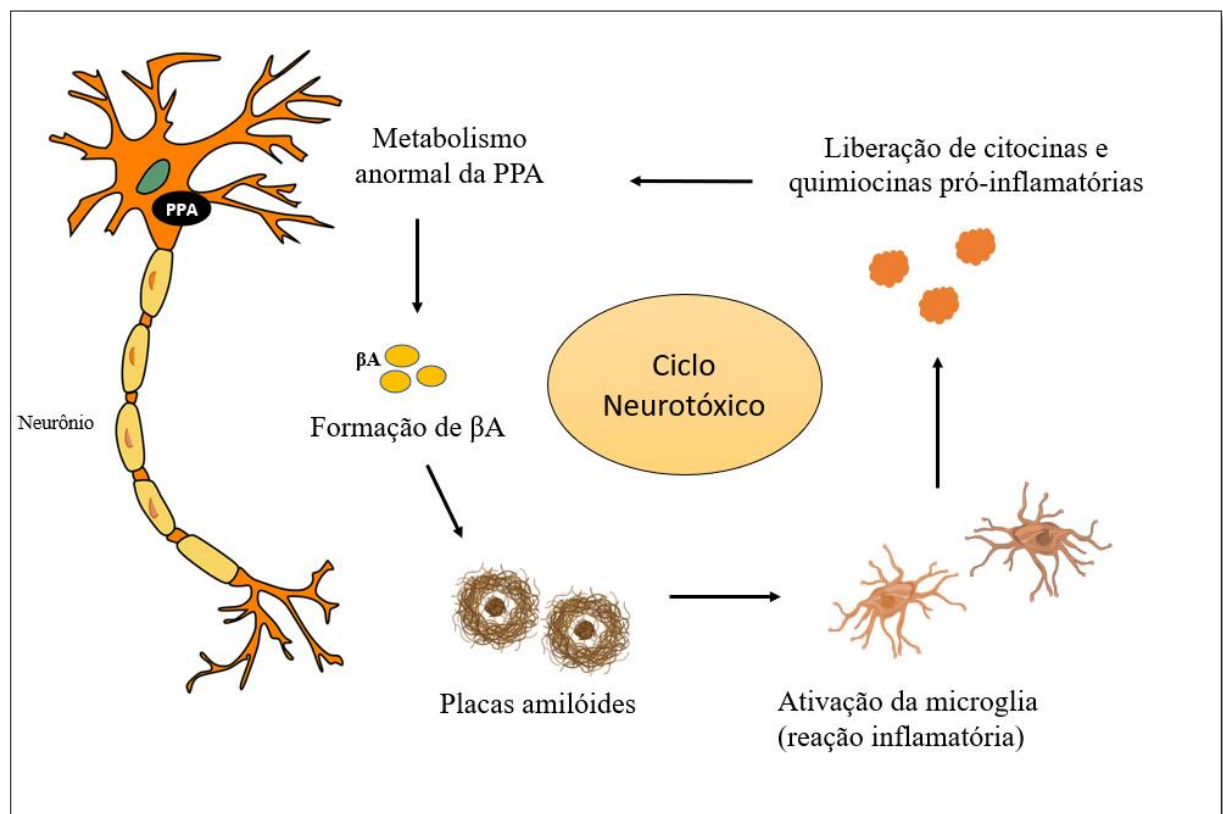


Figura 4. Demonstração do metabolismo anormal da proteína precursora amiloide (PPA) estimulando o depósito de peptídeo beta amiloide, que quando em acúmulo formam as placas senis ou placas amilóides, ativando a microglia que liberam excessivas quimiocinas e citocinas pró inflamatórias, que estimulam a PPA na deposição de mais peptídeos βA, se tornando um ciclo neurotóxico. (Imagem autoral)

Portanto, a supressão da neuroinflamação na DA por medicamentos com potenciais anti-inflamatórios podem representar um alvo terapêutico na minimização e/ou reversão dos eventos patológicos moleculares que se refletem nos problemas cognitivos e fisiológicos dos pacientes com DA. (HENSEY, 2010; BISCARO et al., 2012; MCGEER e MCGEER, 2013; SHADFAR et al., 2015; BUDN et al., 2016, NIZAMI et al., 20019)

Um dos medicamentos que vem sendo testado é a minociclina. A minociclina é um derivado de segunda geração da tetraciclina com ação antimicrobiana bacteriostática

(GARRIDO-MESA et al., 2013; SHAMIM e LASKOWSKI, 2017). Trata-se de uma molécula altamente lipofílica que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica possibilitando sua aplicação no tratamento de doenças que acometem o SNC. (KIELIAN et al., 2017; KUANG et al., 2009). Além dos seus efeitos antibacterianos, a minociclina possui propriedades anti-inflamatórias independentes da sua ação antimicrobiana, exercendo capacidade neuroprotetora, limitando a inflamação e o estresse oxidativo (KUANG et al., 2009). As propriedades anti-inflamatórias da minociclina são possivelmente fornecidas através de sua capacidade de inibir a proteína quinase p38 ativada por mitógeno (p38 MAPK) e a metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) (TIKKA et al., 2001; HUNTER et al., 2004 SCHIEVEN, 2005). Dado que, proteína quinase p38 regula a produção de mediadores inflamatórios, sua inativação pela ação da minociclina pode reduzir citocinas liberadas em excesso fornecendo uma neuroproteção contra danos neuronais da neuroinflamação (SCHIEVEN, 2005; BUDN et al., 2016). De fato, em estudos pré-clínicos, a minociclina apresentou atividade neuroprotetora em várias doenças neurodegenerativas, tais como, doença de Parkinson (WU et al., 2002), esclerose lateral amiotrófica (ZHU et al., 2002), doença de Huntington (CHEN et al., 2000), e na Doença de Alzheimer (CHOI et al., 2007; NOBLE et al., 2009; PARACHIKOVA et al., 2010). Dessa forma, a minociclina aparenta ser um fármaco promissor no processo de neuroinflamação da DA. Portanto, são necessários mais estudos para a elucidação dos mecanismos de ação da minociclina nas células da micróglia.

Diante desse cenário clínico, o uso de modelos de animais é crucial na definição de mecanismos críticos da doença e na avaliação de novas abordagens terapêuticas (LAFERLA e GREEN, 2012). Um modelo animal que replica aspectos comportamentais e moleculares da DA esporádica (DAE), é o modelo estreptozotocina, criado pela injeção intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina (GRUNBLATT et al., 2004; HOYER e LANNERT, 2007; TOTA et al., 2010; CORREIA, 2011; SALKOVIC-PETRISIC, 2013, RAI et al., 2014; KNEZOVIC et al., 2015). Essa abordagem é vantajosa, visto que a partir dos resultados, é possível transcender de forma mais confiável para sistemas fisiológicos humanos. Nesse contexto, Vicente et al. (2018) demonstrou que após 30 dias da icv de STZ, os animais além de apresentarem problemas cognitivos clássicos da DA, apresentaram problemas respiratórios, alterações do ciclo sono-vigília, e aumento na expressão do peptídeo beta amiloide, em uma importante região do sistema nervoso central envolvida no controle respiratório e na quimiossensibilidade central, o *Locus Coeruleus* (LC) (BIANCARDI et al., 2008; GARGAGLIONI et al., 2010; VICENTE et al., 2016).

Tomado esse conjunto de achados, os autores sugerem que as disfunções respiratórias encontradas no modelo podem ser decorrentes do aumento na expressão do peptídeo beta amilóide na região do LC, com um potencial quadro neuroinflamatório. Dessa maneira, uma intervenção farmacológica que inativa a neuroinflamação induzida pelo peptídeo β A pode minimizar e/ou reverter as disfunções fisiológicas encontradas no presente modelo. Além de, extrapolar o tratamento para estudos mais robustos como um potencial alvo terapêutico. Com isso, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da administração farmacológica de minociclina nas células da micróglia do *Locus Coeruleus* em um modelo experimental da Doença de Alzheimer Esporádica (DAE).

4. OBJETIVO

Investigar o efeito do tratamento com minociclina nas alterações comportamentais induzidas pela STZ e na morfologia das células da micróglia no do *Locus Coeruleus*, região em que foi demonstrado o aumento do peptídeo beta amilóide sugerindo um potencial quadro de neuroinflamação no modelo para DA.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Estatísticas da Doença de Alzheimer

O crescimento da expectativa de vida média da população mundial tem sido acompanhado do aumento na prevalência de doenças neurodegenerativas, características do envelhecimento, como a doença de Parkinson, isquemia cerebral (popularmente chamada de derrame) e, especialmente, a Doença de Alzheimer (DA) (IRVINE et al, 2008). Os casos de Alzheimer e outras formas de demência tendem a aumentar nas próximas décadas nos países em vias de desenvolvimento segundo a *Alzheimer's Disease International* (ADI). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a doença de Alzheimer como uma prioridade global de saúde pública.

No Relatório Mundial de Alzheimer 2020, a ADI apresenta dados importantes como a ocorrência de um novo caso de demência a cada 3 segundos, mais de 50 milhões de pessoas vivendo com demência e uma estimativa de um total de 82 milhões em 2030 e 152 milhões em 2050, já sendo a quinta causa de morte no mundo (ADI, 2020).

No Brasil, são poucos os estudos sobre morbimortalidade por doença de Alzheimer. A maioria aborda as demências em geral ou se restringem a pequeno tamanho de amostra, geralmente em unidades hospitalares, instituições asilares ou grupos socioeconomicamente diferenciados (FAGUNDES et. al, 2011; RIBEIRO et al, 2013). A escassez de dados nacionais constitui uma lacuna no conhecimento do perfil epidemiológico da doença no país, apesar do seu conhecido impacto sobre o doente, a família e o cuidador (PINTO et al. 2009).

Neste contexto, TEIXEIRA et al. (2015) realizou um estudo sobre a mortalidade por DA no Brasil entre os anos de 2000 e 2009, e verificou que foram registrados 1.505.326 óbitos na população de 60 anos ou mais, residentes nas capitais brasileiras, dos quais 0,4% teve a doença de Alzheimer como causa básica e 0,8% como causa mencionada (TEIXEIRA et al, 2015). Considerando o conjunto dos óbitos por doenças do sistema nervoso central em 2009, a DA codificada como causa básica de morte representou 65% dos óbitos entre as mulheres e 51,1% entre os homens. (TEIXEIRA et al, 2015)

5.2 Locus coeruleus e a DA

O LC é um núcleo pontino que contém o maior grupamento de neurônios noradrenérgicos no sistema nervoso central (ŠIMÍČ, et al. 2017; USHER et al., 1999), além de ser o principal núcleo noradrenérgico afetado na DA (MRAVEC e CUBINKOVA et. al. 2014). Nas últimas décadas, uma grande quantidade de dados foi obtida em modelos animais e pacientes, relacionando a ocorrência de alterações/degeneração do LC com a patogênese da DA. Os primeiros estudos datam do início dos anos 1980, quando foi demonstrada a ocorrência de perda celular no LC em pacientes com DA (BONDAREFF et al., 1982; MANN, YATES, e MARCYNIUK, 1984; TOMLINSON et al., 1981). Foi observado uma porcentagem de perda de neurônios de cerca de 70% nos estágios terminais da doença (BONDAREFF et al., 1982; ZWEIG et al. 1988) e, conseqüentemente, uma redução nas concentrações de noradrenalina, sendo concebível que muitas funções reguladas pelo LC sejam severamente comprometidas na DA avançada.

Está bem estabelecido que as células noradrenérgicas (NA) do LC são extremamente sensíveis a patologias e doenças neurodegenerativas de envelhecimento, além de que a tau hiperfosforilada aparece no LC antes de qualquer outra região do encéfalo na DA (POE et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2012; RÜB, U et al., 2001). Neste contexto, Braak e seus colegas (2011) fizeram uma descoberta inovadora, onde analisaram encéfalos de

indivíduos com diferentes graus de DA, incluindo os que ainda não apresentavam patologia relacionada a Tau no córtex entorrinal (região que era considerada, até aquele estudo, como o primeiro local envolvido pela Tau na DA) e demonstraram que um acúmulo progressivo de Tau hiperfosforilada nos neurônios do LC precede em anos a ocorrência da mesma no córtex entorrinal (BRAAK et al., 2011).

Para verificar a relação entre o número de neurônios do LC e a cognição, WILSON et al., (2013) avaliaram a densidade neuronal em quatro núcleos neuromoduladores subcorticais: o *Locus coeruleus* noradrenérgico, a rafe dorsal serotoninérgica, a área tegumental ventral dopaminérgica e substância negra, em relação ao declínio cognitivo medido ao longo de seis anos pré-mortem. Como resultado, foi visto que a densidade mais alta em cada núcleo separadamente estava associada a um declínio cognitivo mais lento, mas quando todos foram modelados juntos, apenas a densidade celular do LC previu a taxa de declínio cognitivo. (WILSON et al., 2013).

Além disso, estudos post-mortem mais recentes obtidos por análise estereológica indicaram que a perda neuronal do LC não parece ser um componente do envelhecimento normal (THEOFILAS et al., 2017). Dessa forma, a degeneração do LC deve ser considerada um achado patológico, e não uma consequência natural do envelhecimento.

5.3 Micróglia e Neuroinflamação da DA

As alterações moleculares da DA são caracterizadas pelo acúmulo extracelular das placas senis e de emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFTs), principais biomarcadores moleculares da DA. A inflamação do SNC na DA é resultado da ativação das células da micróglia em resposta a formação das placas amilóides (ou acúmulo extracelular do peptídeo β A1-42) e/ou da hiperfosforilação da proteína tau (NFTs). Isso ocorre na tentativa ineficaz da remoção dos componentes moleculares tóxicos e aumentam citocinas e quimiocinas, criando-se um ciclo vicioso e crônico de neuroinflamação que acelera a neurodegeneração da DA. (Figura 4 e 5)

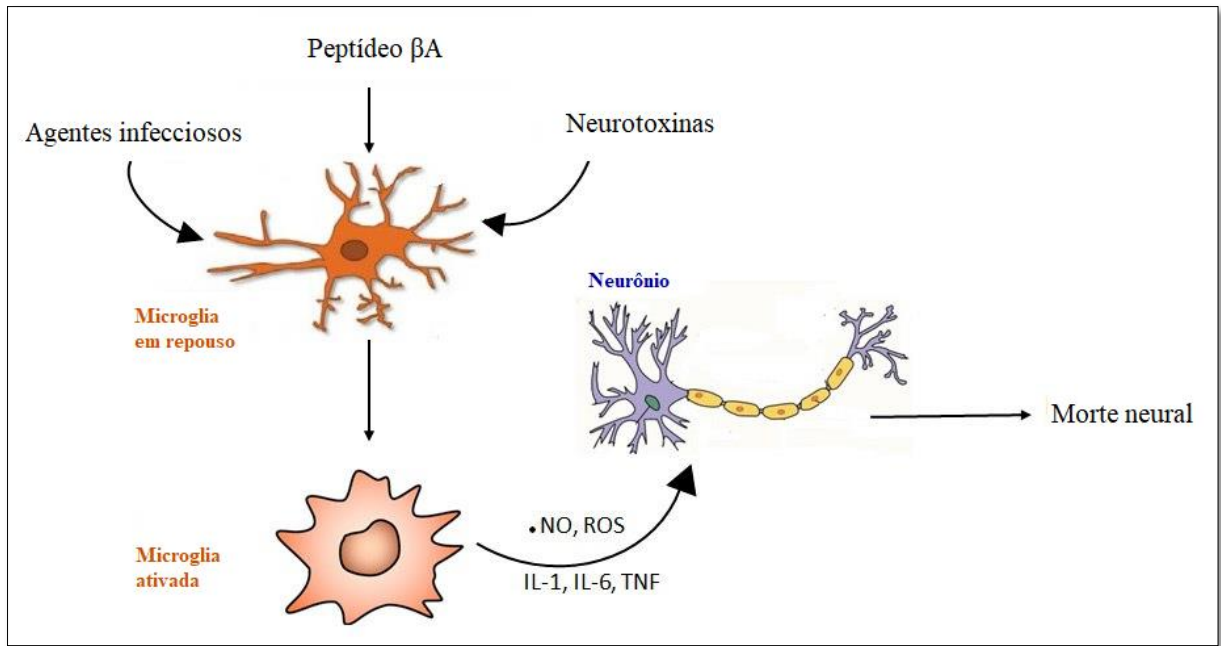


Figura 5. Neuroinflamação mediada por micróglia. Os peptídeos que compreendem placas amilóides (peptídeos A β) características da doença de Alzheimer, outras neurotoxinas ou agentes infecciosos podem iniciar sinais de ativação na micróglia em repouso, os macrófagos residentes no tecido do SNC. A conversão para o fenótipo microglial ativado é frequentemente acompanhada pela liberação de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), junto com a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e fatores de necrose tumoral (TNF). Esse meio inflamatório cria um ambiente tóxico que leva à disfunção neuronal e à morte. Imagem adaptada de Sigmaaldrich.

As micróglias ativadas e em proliferação aparecem nos locais onde ocorrem danos neuronais como parte da resposta à lesão, sendo um componente chave para a resposta inflamatória e representando uma característica patológica comum de várias doenças neurodegenerativas, incluindo a DA.

Para estudar a implicação microglial na perda de sinapses, no declínio cognitivo patológico através do estresse crônico, no envelhecimento e doenças, BISHT, et al., (2016) realizaram análises ultra estruturais de micróglias e descobriram a existência de um novo fenótipo microglial que raramente está presente em condições de estado estacionário, mas torna-se abundante durante o estresse crônico, envelhecimento, deficiência de sinalização de fractalcinas (camundongos *knockout* CX3CR1) e Doença de Alzheimer (camundongos APP-PS1).

YANG et al (2017) demonstraram que em certas circunstâncias, as espécies β A de alto peso molecular no córtex de humanos com DA se dissociam em pequenas espécies β A oligoméricas neurotóxicas, e a administração desta substância em camundongos ativa a micróglia *in vivo*.

Em relação a micróglia do *Locus coeruleus*, HENEKA et al. (2010) verificaram que a exposição de células micrógliais à β A1-42 fibrilar (f β A1-42) por 4 h causou uma rápida

indução da transcrição do gene pró-inflamatório para Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF α), ligante de C-C de quimiocina 2 (CCL2) ou proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP1), Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e Ciclo-oxigenase-2 (COX2). Eles observaram que a estimulação da via LC-NA produziu uma forte redução das concentrações de citocinas, juntamente com o aumento da ativação da micróglia e promoção da fagocitose β A pela própria micróglia. Por outro lado, eles descobriram que a lesão de LC com DSP-4 causou uma redução dramática da ativação da micróglia e fagocitose, bem como uma liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a presença de NA no LC durante a estimulação com β A1-42 diminuiu significativamente a resposta inflamatória, mostrando que a queda na concentração de NA se correlaciona fortemente com a micróglia, e conseqüentemente com a progressão e extensão da disfunção de memória e prejuízo cognitivo. (HENEKA et al. 2010)

Apesar dos grandes avanços em nossa compreensão da fisiopatologia da DA e de como a doença é conceituada, desde que Alois Alzheimer relatou o primeiro caso em 1907, ainda não há tratamentos modificadores da doença. O tratamento farmacológico disponível atualmente para DA é apenas paliativo, não sendo capaz de evitar o desfecho da doença ou a sua evolução (SCHMIDT et al., 2015).

5.4 Minociclina

A minociclina é uma tetraciclina de segunda geração, uma molécula altamente lipofílica que pode atravessar efetivamente a barreira hematoencefálica (BROGDEN, SPEIGHT e AVERY, 1975). Possui ação antimicrobiana bacteriostática, inibindo a síntese proteica, com amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. É utilizado há mais de 30 anos e ultimamente sua utilização é mais comum no tratamento da acne vulgar (GARRIDO-MESA et al., 2013). O tratamento a longo prazo em dosagens de até 200 mg/dia é considerado pela FDA bem tolerado e seguro em seres humanos, sendo os efeitos adversos mais comuns, náuseas, irritação gastrointestinal, vertigens e tontura moderada, que desaparecem com a descontinuação do tratamento (GROUP, 2004)

Além de suas propriedades antibióticas, foi relatado que a minociclina tem efeitos neuroprotetores em vários modelos experimentais de isquemia cerebral (YRJANHEIKKI et al., 1999), lesão cerebral traumática (MEJIA et al., 2001), esclerose lateral amiotrófica (ELA) (ZHU et al., 2002), doenças de Parkinson (DP) (WU et al., 2002), tratamento com ácido caínico

(HEO et al., 2006), doença de Huntington (HD) (CHEN et al., 2000; WANG et al., 2003), e esclerose múltipla (POPOVIC et al., 2002).

Em um modelo de isquemia do prosencéfalo de gerbil, a minociclina evitou a ativação da micróglia, reduzindo o tamanho da lesão e aumentando a sobrevivência dos neurônios do hipocampo, mesmo quando o tratamento foi iniciado após o insulto isquêmico. Esses efeitos foram acompanhados por uma redução dos níveis de enzima conversora de IL-1 β , COX-2 e iNOS nas regiões afetadas do cérebro (YRJÄNHEIKKI et al., 1998; 1999).

HUNTER et al. (2004) realizaram o primeiro estudo descrevendo os efeitos da minociclina em um modelo de DA em roedores, utilizando injeções intracerebroventriculares da toxina de μ -p75-saporina. Os autores observaram uma redução da transcrição de mediadores pró-inflamatórios e inativação das células da micróglia, acompanhado de uma melhora no comprometimento cognitivo dos animais. SEABROOK et al. (2006) verificaram que a minociclina suprimiu a produção microglial de inflamatórios (IL-1b, IL-6 e TNF) induzidas por 24 h de incubação com peptídeo β A1-42.

No estudo de CHOI (2007) foi demonstrado que a minociclina melhorou os prejuízos de aprendizagem e memória no modelo de rato com DA infundido com β A1-42 (CHOI, 2007). De forma similar, o tratamento com minociclina foi capaz de corrigir deficiências comportamentais e reduzir os níveis de marcadores inflamatórios e trímeros β A em um processo inflamatório pré-placa inicial em um modelo de rato transgênico semelhante à doença de Alzheimer. (CUELLO et al., 2010).

A supressão de ativação e proliferação microglial é hipotetizada como sendo o principal mecanismo pelo qual a minociclina exerce seu efeito neuroprotetor (TIKKA et al., 2001; TIKKA e KOISTINAHO 2001). Esses trabalhos mostraram que a minociclina exerce efeitos neuroprotetores baseados em suas ações anti-inflamatórias em modelos animais experimentais de DA. Desse modo, este estudo busca investigar o efeito da minociclina em um modelo animal da DAE como uma possível estratégia terapêutica. Porém, os mecanismos neuroprotetores desse fármaco na DA ainda não estão totalmente elucidados, justificando assim, a relevância do presente estudo.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 - Animais

Os experimentos foram realizados com ratos machos Wistar, pesando de 300 a 350 gramas, com idades entre 3 e 4 meses. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, acondicionados à temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acesas às 6 horas e 30 minutos e apagadas às 18 horas e 30 minutos). As ofertas de ração e água foram ad libitum. O estudo foi realizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP Campus Jaboticabal e conduzido de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) e com a aprovação da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEUA) da FCAV/UNESP, protocolo n° 6.030/016.

6.2 - Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por *Streptozotocina* (STZ)

A indução do modelo animal de DA esporádica ocorreu por procedimento estereotáxico, no qual o animal foi submetido à injeção intracerebroventricular de STZ (2 mg/Kg) (2 uL por ventrículo) (Sigma, St. Louis, MO). Nos animais do grupo Placebo foi injetado o mesmo volume de tampão citrato. Foram selecionados ratos de 300-350 gramas, com idades entre 3 e 4 meses. Para o procedimento de estereotaxia, os animais foram anestesiados com a combinação de xilazina e cetamina, na proporção de 20 mg/Kg e 100 mg/kg, respectivamente (VICENTE et al., 2018). Os anestésicos foram injetados na região intraperitoneal e, após 10 minutos, foi avaliada a eficiência da sedação por testes de reflexo. Após a sedação, foi realizada tricotomia da região a ser operada. O animal foi fixado ao aparelho estereotáxico por barras intra-auriculares e pelos dentes incisivos superiores e, após a fixação, a região a ser operada foi higienizada com álcool iodado (PVPI). Foi realizada uma incisão sagital de aproximadamente 2 cm de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o bregma (Figura 6A). Após incisão da pele, foram feitos dois pequenos orifícios bilaterais utilizando uma broca odontológica, (Figura 6B) nos locais onde foram aplicadas as injeções (Figura 6C). A partir do bregma, foram utilizadas as seguintes medidas: 0,8 mm no eixo anteroposterior, 1,4 mm no eixo médio-lateral e 3,4 no eixo dorsoventral, medidos a partir da superfície do encéfalo já exposto, seguindo orientações do Atlas Estereotáxico de (PAXINOS; WATSON, 2007). A microinjeção da droga e do veículo foi realizada com uma seringa Hamilton de 5 μL , acoplada a um tubo de polietileno

de 50 cm de comprimento, contendo a droga ou o veículo, que, por sua vez, foi acoplado a uma agulha gengival para aplicação (VICENTE et al., 2018).

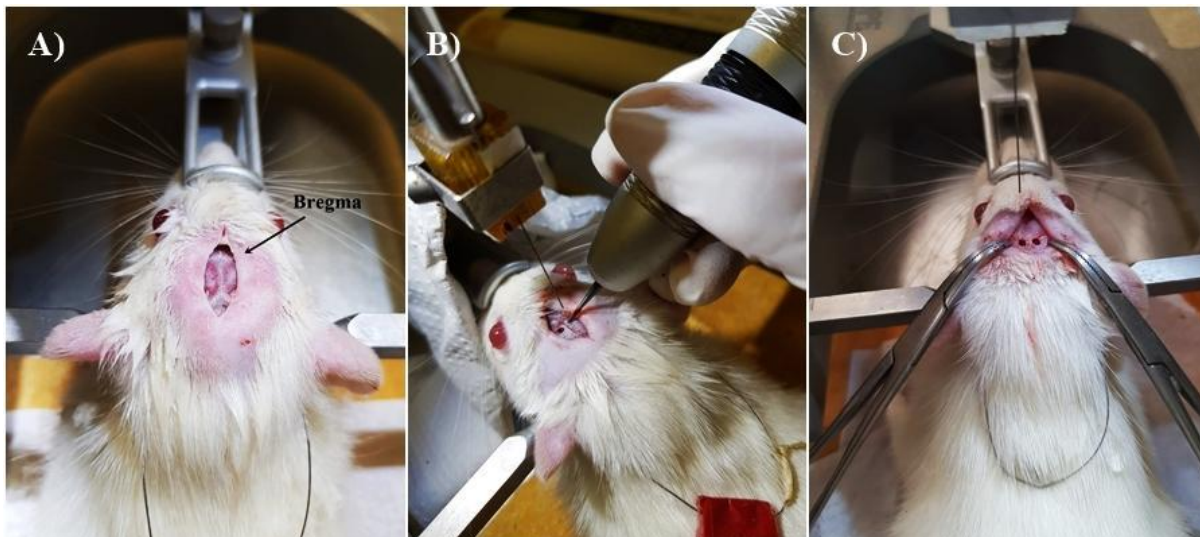


Figura 6: Foto do animal posicionado no aparelho estereotáxico para a cirurgia intracerebroventricular (icv). A) Animal após o corte com bisturi para a exposição do bregma e localização das coordenadas. B) Orifícios bilaterais feitos com a broca. C) Onde será aplicada as injeções de STZ ou tampão de citrato.

6.3 - Tratamento com minociclina

Realizamos o tratamento com minociclina (M9511, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) que teve início 5 dias antes dos experimentos comportamentais, na dose de 30 mg/kg via injeção intraperitoneal (ip) (LIMA-SILVEIRA et al., 2019; MIYAMOTO et al., 2016; SILVA et al., 2018). A minociclina foi diluída diariamente (30 mg de minociclina para 1 ml de veículo/Controle, pH ajustado para 7,4). O grupo Placebo recebeu injeções i.p. de veículo (50% solução salina + 50% de água destilada). Os animais receberam uma dose diária do veículo ou da minociclina durante 5 dias consecutivos.

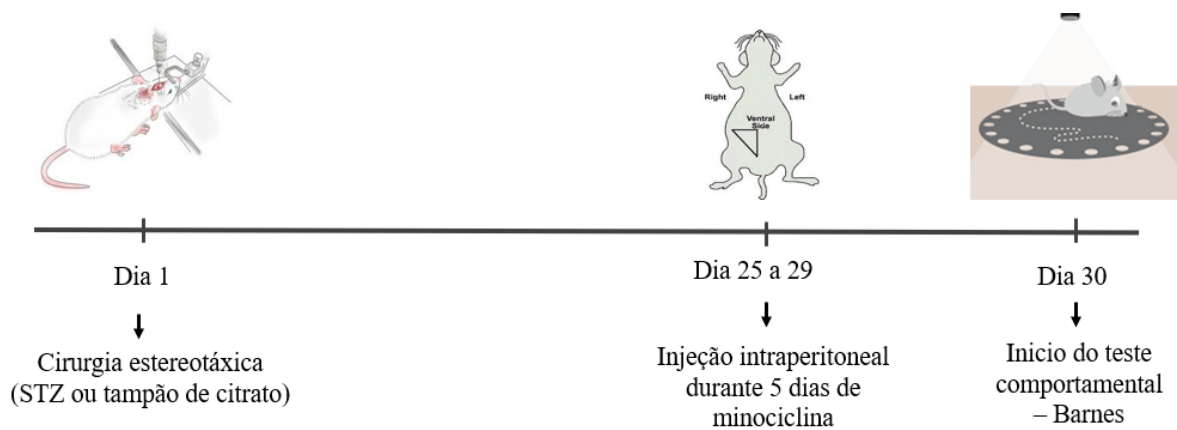


Figura 7: Design experimental demonstrando como foi realizado o tratamento com a minociclina. No dia 1 foi realizado a cirurgia intracerebroventricular para a injeção de STZ (2mg/kg) no grupo Alzheimer e tampão de citrato no grupo Placebo. Após a cirurgia, obteve-se uma janela de 30 dias para realização do teste comportamental com início no dia 30, tendo duração de 5 dias de teste. Além disso, 5 dias antes da realização do teste comportamental (dias 25, 26, 27, 28 e 29) foi feita a aplicação de minociclina diariamente via intraperitoneal. (30mg/kg)

6.4 - Teste comportamental para validação do modelo

Foi realizado um teste comportamental de memória e aprendizado. O teste escolhido foi o Barnes Maze. O teste Barnes Maze foi originalmente desenvolvido pela Dra. Carol Barnes em meados de 1979, e consiste em um teste não aquático destinado a teste de memória e aprendizado espacial (SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010). O teste é constituído de uma plataforma circular (110 cm de diâmetro), com 20 furos igualmente espaçados (10 cm de diâmetro; 7,5 cm entre furos) ao longo do perímetro e elevado 105 cm acima do chão. Em um dos furos (furo alvo), é encaixada uma caixa de escape, de forma que os animais não a veem do centro da plataforma (figura 8). A luz acesa foi usada para aumentar a motivação para a fuga. Inicialmente o animal foi colocado no centro da plataforma, e dado 3 minutos para exploração. Após passado o tempo, o animal foi retirado da plataforma, e 15 minutos depois, no mesmo dia, foi colocado novamente para realizar o treino. Cada animal foi colocado na plataforma 4 vezes durante o mesmo dia.

Os animais foram treinados durante 4 dias (fase de aquisição), para aprender a localização da caixa de escape do labirinto, utilizando pistas espaciais colocadas nas paredes próximas a plataforma na sala de experimento. (figura 8). Após dias dos treinos, no 5º dia, os animais foram submetidos ao teste de retenção de memória, onde a caixa de escape foi retirada da plataforma. Foi avaliado quanto tempo os animais exploram o quadrante alvo, onde anteriormente ficava a caixa escape, num tempo total de 90 segundos. Para evitar que os animais utilizassem pistas olfativas, o labirinto foi limpo com solução de álcool. O experimento foi

gravado por câmeras de vídeo e analisados posteriormente, para a menor interferência possível do pesquisador no comportamento dos animais. Para a interpretação do teste, foi verificado que quanto mais rápido o animal localiza o furo alvo, que é considerado um lugar seguro para ele, representa melhora na memória espacial.

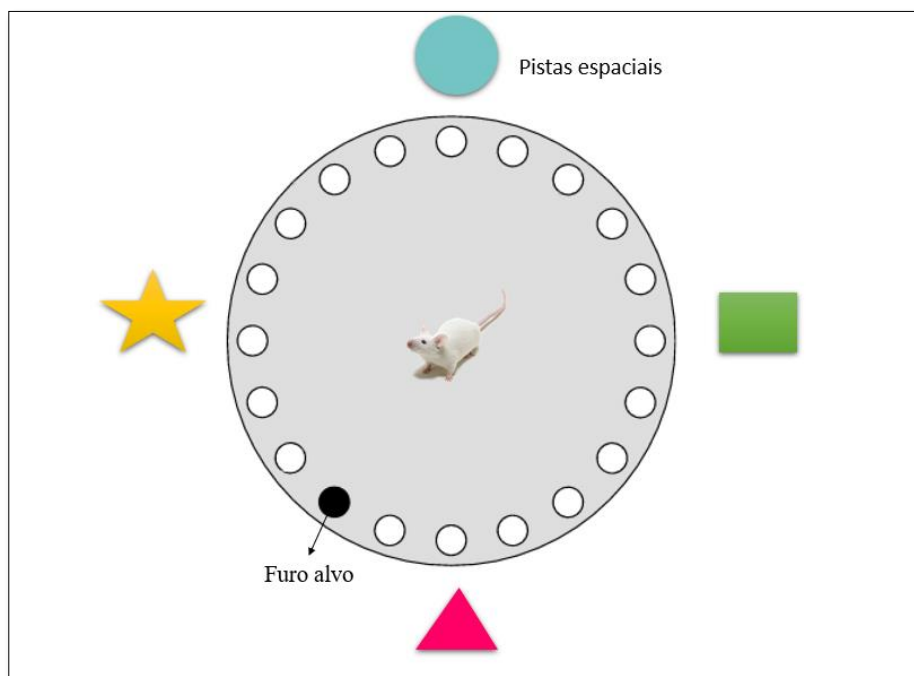


Figura 8: Plataforma do Barnes Maze (adaptado de Sunyer et al., 2007) com as pistas espaciais para a orientação e localização do animal na plataforma, e a caixa de escape posicionada abaixo do furo alvo.

6.5 – Imuno-histoquímica

Após os 5 dias de tratamento com minociclina, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina a 0,9% seguido pela solução de paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão tetraborato de sódio 0,1 M (PFA/bórax; pH 9,5 a 4°C). Em seguida, os encéfalos foram coletados e fixados por 24 horas em 4% PFA/bórax e então colocados em 20% de sacarose por 48 horas a 4 °C, e finalmente congelados e armazenados em freezer a -20°C até a imuno-histoquímica. Para a imuno-histoquímica, os encéfalos foram cortados em um criostato em secções coronais de 40 µm contendo a região do *Locus coeruleus* (LC) (Figura 4) e foram colocados em uma solução crioprotetora fria (tampão de fosfato de sódio 0,05 M, etilenoglicol 30% e glicerol 20%) (TENORIO-LOPES et al., 2017). Similar a outros estudos, a marcação das células da micróglia ocorreu através da marcação da molécula-adaptadora de ligação 1 (Iba-1), uma proteína presente nas células de micróglia (ANSORG et

al., 2015, KORZHEVSKII e KIRIK, 2016; TENORIO-LOPES et al., 2017; BALDY et al. 2018). O tecido foi processado para a posterior incubação dos anticorpos correspondentes (primário: anti-Iba-1 feito em coelho, concentração: 1: 750; secundário: IgG de cabra anti-coelho, diluição: 1/200 (*Vector Laboratories*) seguidos da montagem de lâminas as secções contendo a região do LC foram visualizadas sob um no microscópio (Eclipse E600 - Nikon) equipado com câmera (*Infinity 3 - Lumenera Corporation*) e armazenadas como imagens digitais.

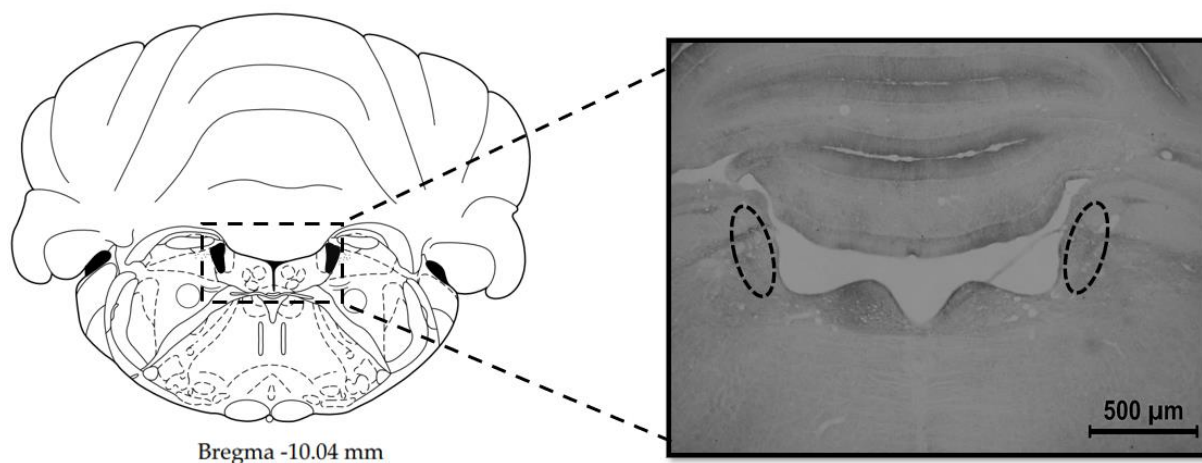


Figura 9: Foto representativa de um corte coronal da região do *Locus Coeruleus* representada dentro do desenho em preto no aumento de 2,5x após a imuno-histoquímica (iba-1) para a marcação de células micrógliais. (Paxinos; Watson, 2004)

6.6 - Efeito do tratamento de minociclina nas células da micróglia na DAE

6.6.1 Densidade celular

Para análise da densidade celular foi utilizado o atlas do encéfalo de ratos (PAXINOS; WATSON, 2007) e realizado imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH) para auxiliar na marcação das células que delimitam a região do LC, como mostrado na Fig. 10a (DE CARVALHO et al., 2015). Foi feita a construção de um desenho representativo que foi utilizado em todas as fotomicrografias de marcação com o anticorpo para Iba-1 (figura 10b).

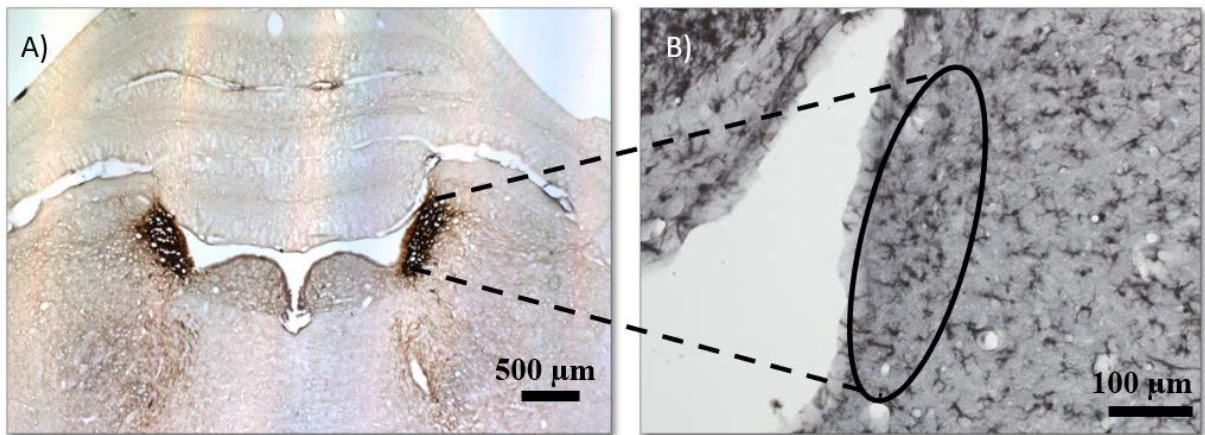


Figura 10. A) Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) para delimitação da região do *Locus coeruleus*. Foto no aumento de 2,5x (escala 500µl) B) Desenho geométrico utilizado para as análises de densidade microglial (Iba-1). Foto tirada no aumento de 20x, contendo o LC do lado direito. Escala (100µm)

6.6.2 Número de células e cálculo da densidade celular

O número de células da micróglia foi contado com auxílio do programa Image J (SCHINDELIN et al., 2012), como pode ser observado na figura 11. Os valores foram utilizados para calcular a densidade de células que será dada pela razão entre o número total de células na área total analisada (LAWSON et al., 1990; VERDONK et al., 2016). O aumento do número de células é um indicativo que as células da micróglia possam estar sendo recrutadas em resposta a um estímulo.

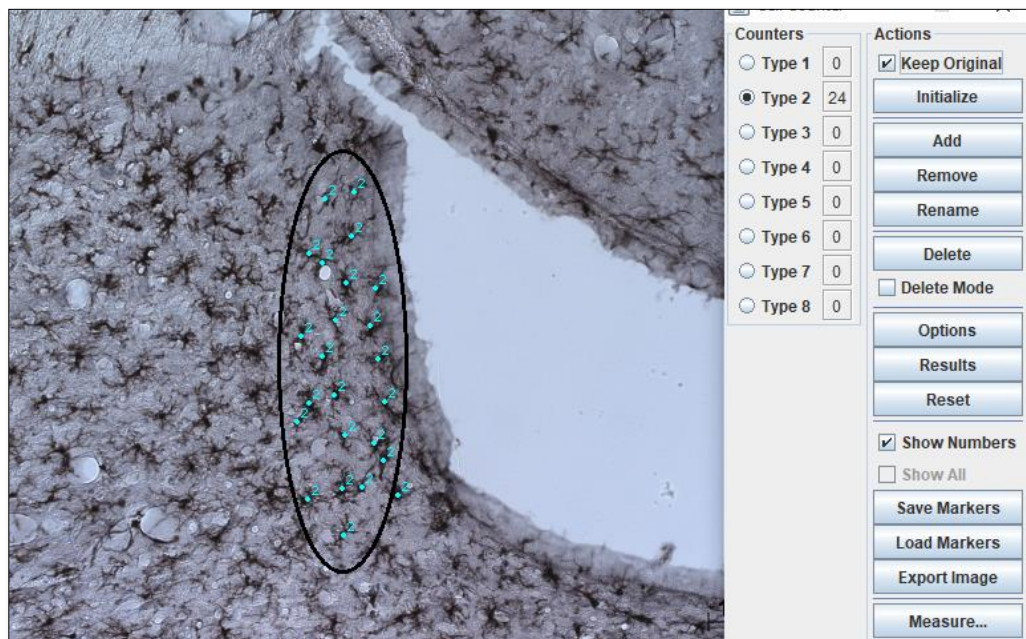


Figura 11. Foto representativa da imunohistoquímica para Iba-1. Em azul os pontos realizados para a contagem (totalizando 24 células nesse exemplo). Em preto, o desenho geométrico foi feito para delimitar a área de contagem.

6.6.3 Morfologia das células de Micróglia

No software Image J (SCHINDELIN et al., 2012), através da conversão de pixels para micrômetros, foi feito um desenho ao redor da célula analisada delimitando a arborização (a) e o corpo celular (c) (Figura 12). Foi repetido esse processo para as 10 células mais próximas em e, então, realizado os cálculos da área do corpo celular e da arborização.

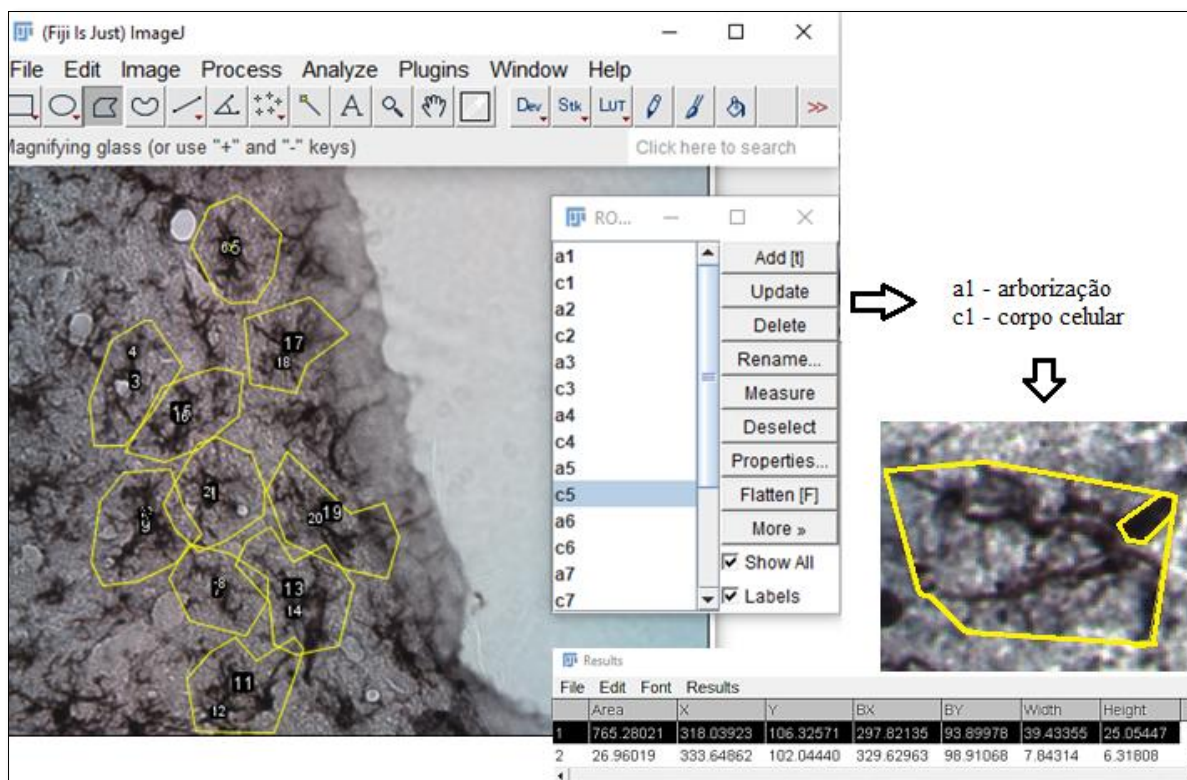


Figura 12. Foto representativa dos desenhos em volta das células micrógliais delimitando a área da arborização (a1, a2, a3...) e a área do corpo celular. (c1, c2, c3...)

Em seguida, as médias das variáveis e a relação entre a área do corpo celular e a área de arborização, e determinamos o índice morfológico - um parâmetro que mostra mudanças morfológicas na micróglia (VERDONK et al., 2016). O índice morfológico permite afirmar que as variáveis consideradas favorecem a forma ativada das células de micróglia, em relação à forma de repouso (TREMBLAY et al., 2010; VERDONK et al., 2016).

6.6.4 Distância vizinha mais próxima (NND)

Após analisar a morfologia de 10 células na área delimitada, essas células foram selecionadas e todas as células próximas para as analisar através da ferramenta de extensão

“NND - *Nearest Neighbor Distance*” desenvolvida por Y. Mao (YUXIONG MAO, 2016) dentro do software Image J (SCHINDELIN et al., 2012). Alterações no NND podem indicar motilidade das células da micróglia (STOWELL et al., 2018).

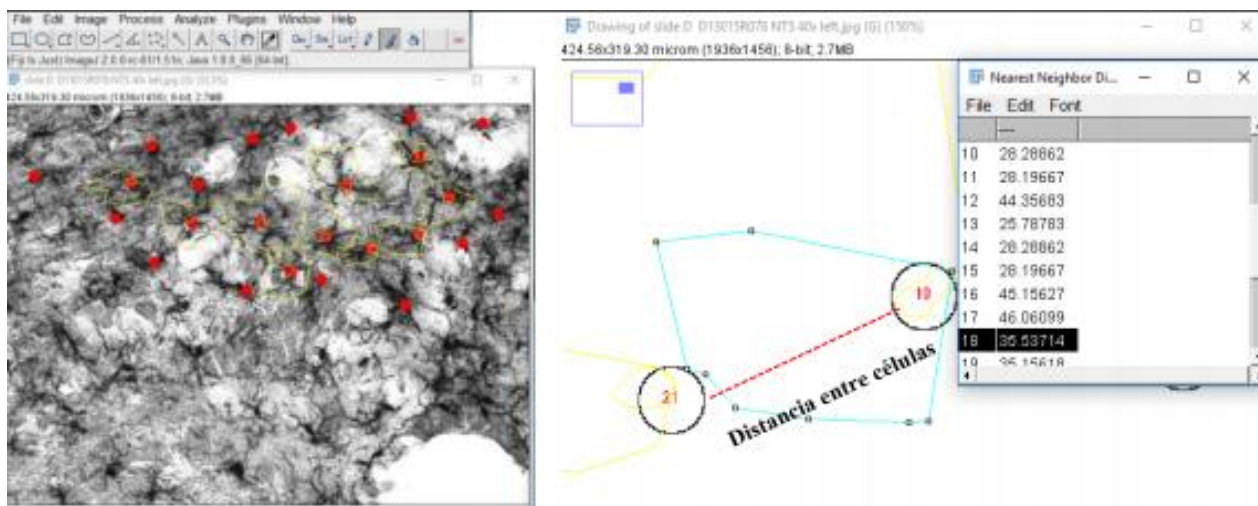


Figura 13. Foto representativa da imuno-histoquímica para Iba-1 para o cálculo da distância entre cada célula (marcada em vermelho).

6.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo *GraphPad Prism software* (versão 8 para Windows). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes e os dados são apresentados como médias do grupo \pm S.E.M. para cada parâmetro investigado. O teste comportamental foi analisado por meio de uma ANOVA de duas vias. Densidade celular e as variáveis morfológicas da micróglia foram analisados por meio de uma ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bartlett.

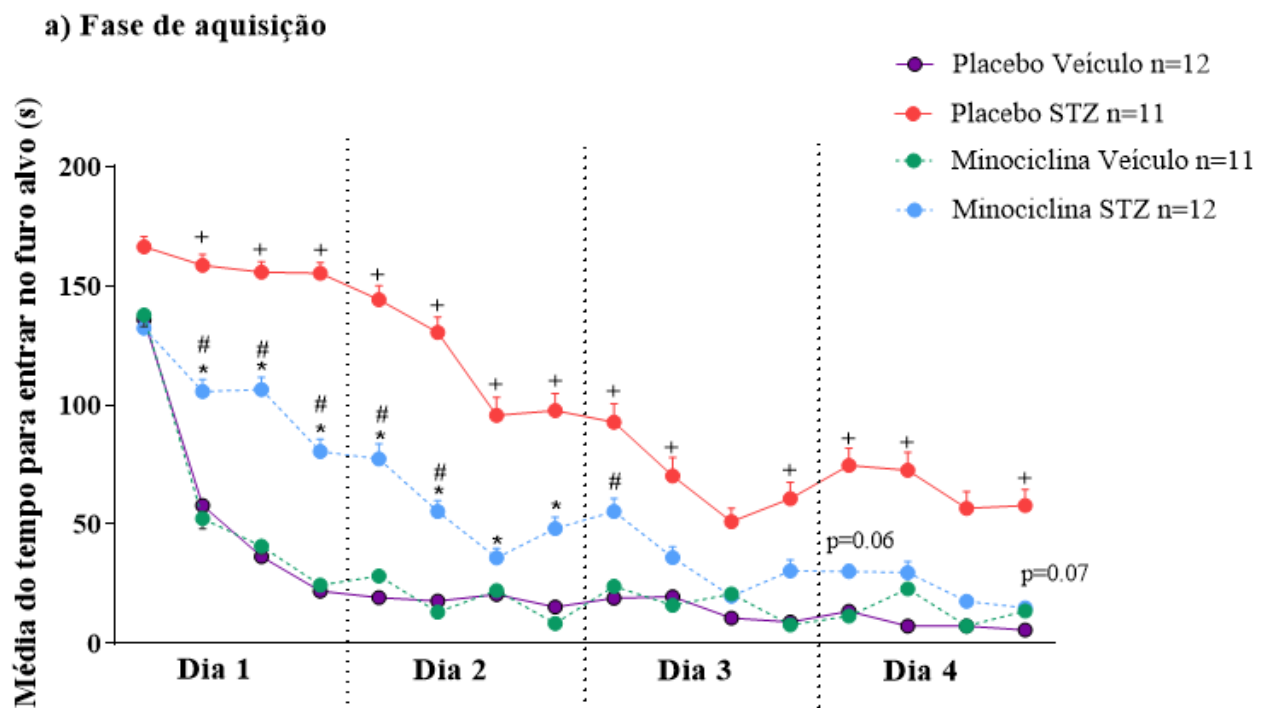
7. RESULTADOS

7.1 - Efeitos da minociclina na aprendizagem e na memória espacial (Teste de Barnes)

Na figura 14A, estão representados os valores do tempo de latência (s) dos animais para encontrar a caixa de escape no furo alvo durante a fase de aquisição (dia 1 ao 4). Foi

observado que todos os grupos diminuíram o tempo para encontrar a caixa escape do furo alvo com o passar dos dias (Placebo-Veículo-: D1:T1 $152,8 \pm 32,5$ vs D4:T4 $7,0 \pm 4,9$ segundos) (Minociclina-Veículo: D1:T1 $127,4 \pm 57,5$ vs D4:T4 $13,5 \pm 6,8$ segundos) (Placebo-STZ-: D1:T1 $151,5 \pm 40,8$ vs D4:T4 $52,9 \pm 65,7$ segundos) (Minociclina-STZ: D1:T1 $127,4 \pm 57,5$ vs D4:T4 $13,5 \pm 6,8$ segundos) ($p < 0,05$ teste ANOVA de duas vias). No grupo Placebo (Veículo X STZ) é possível observar a diferença da latência (s) durante os quatro dias de treinamento. Em comparação, o grupo Minociclina (Veículo X STZ) teve diferença apenas nos dois primeiros dias. Observamos que o grupo Minociclina STZ apresentou um tempo menor para encontrar a caixa de escape em comparação com o grupo Placebo STZ do dia 1 ao dia 3 ($p < 0,05$ teste ANOVA de duas vias), o que não ocorre no dia 4 ($p > 0,05$ teste ANOVA de duas vias), sugerindo o efeito da minociclina em melhorar a aprendizagem do modelo para DA. Não foi observado diferença entre o grupo Placebo-veículo e Minociclina-veículo ($p > 0,05$ teste ANOVA de duas vias).

No dia teste (figura 14B) estão representados o número de tentativas de cada grupo em buscar o furo alvo. É observado que o grupo Minociclina-STZ ($3,8 \pm 2,9$) apresentou um número maior de acertos ao furo alvo, em comparação com o grupo Placebo STZ ($2,2 \pm 1,1$) ($p < 0,05$ teste ANOVA de duas vias), sendo o Placebo STZ o grupo com menos acertos. Não foi observado uma diferença significativa entre os grupos Placebo-veículo e Minociclina-veículo. ($p < 0,05$ teste ANOVA de duas vias).



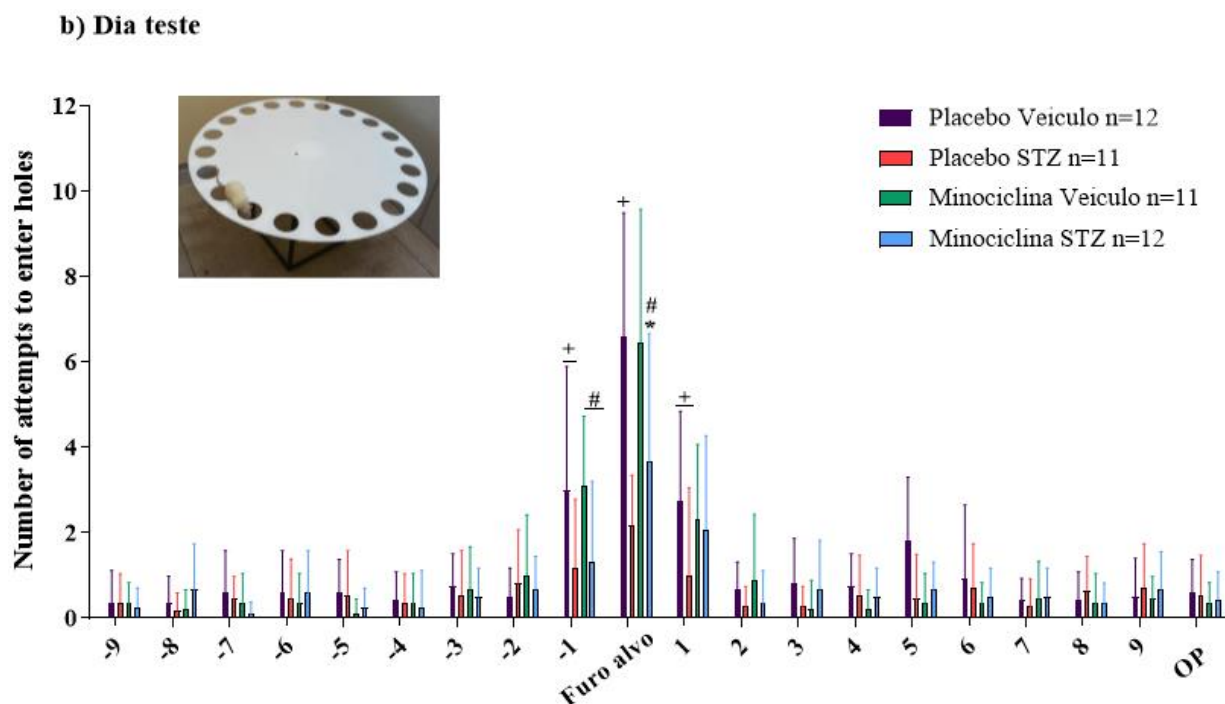


Figura 14. Efeito da administração de minociclina (30 mg/kg) sobre a aprendizagem e memória espacial no labirinto de Barnes. A) Média de tempo em segundos para encontrar a caixa escape nos 4 treinamentos por dia (dia 1 a dia 4) dos grupos Controle (Veículo e STZ) e Minociclina (Veículo e STZ). B) Média dos números de tentativas no furo alvo da plataforma no teste prova do labirinto de Barnes dos grupos Placebo (Veículo e STZ) e Minociclina (Veículo e STZ). Os valores são expressos como média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre as médias do grupo Placebo (veículo x STZ), + indica diferença significativa entre as médias do grupo Minociclina (veículo x STZ). # indica diferença do STZ Placebo x STZ minociclina

7.2 - Efeitos da minociclina nas células da micróglia na região do Locus coeruleus

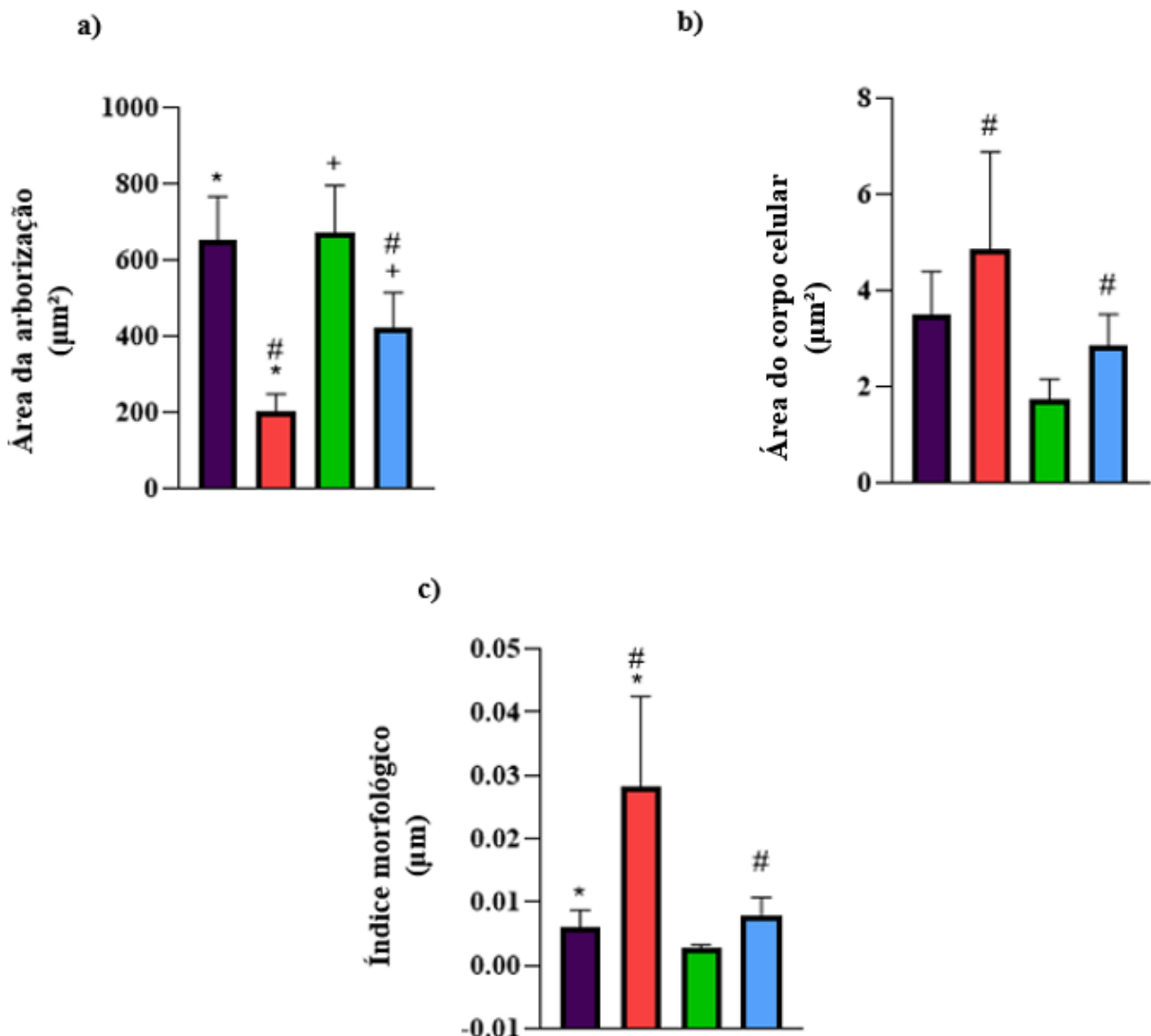
A figura 15a representa a área da arborização das micróglia, onde observamos que o grupo Minociclina-STZ (420 ± 93.13) obteve uma área maior de arborização em comparação com o grupo Placebo-STZ (200 ± 47.14). Nos grupos Placebo-veículo (654 ± 113.3) e Minociclina-veículo (674 ± 121.3) não foi observado diferença significativa. ($p < 0,05$).

A figura 15b está representando a área do corpo celular das micróglia, onde a área do grupo Minociclina-STZ (2.87 ± 0.6272) é menor do que a do grupo Placebo-STZ (4.85 ± 2.032). Esses resultados sugerem que após o tratamento com minociclina, a arborização das células do grupo Placebo-STZ aumentou ($p > 0,05$) e a área do corpo celular diminuiu ($p > 0,05$), indicando o retorno da micróglia à sua forma reativa.

Observamos também uma diminuição do índice morfológico (figura 15c) no grupo Minociclina-STZ (0.007 ± 0.0027) que reflete a inativação das células da micróglia no modelo

de DA. O grupo Placebo-STZ (0.028 ± 0.0143) foi o grupo com o maior índice morfológico, indicando que a micróglia está na sua forma mais ameboide nesse tratamento. (figura 15d)

Na figura 15e observamos que o grupo Minociclina-STZ (0.72 ± 0.086) obteve uma menor densidade celular comparada com o grupo Placebo-STZ (0.94 ± 0.12). Nesse parâmetro analisado os grupos Placebo-veículo (0.47 ± 0.089) e Minociclina-veículo (0.33 ± 0.095) não obtiveram diferenças significativas entre eles. ($p > 0,05$). Não observamos alterações na locomoção (distância entre as células, $p < 0,05$) das células da micróglia no modelo STZ após o tratamento. (figura 15f).



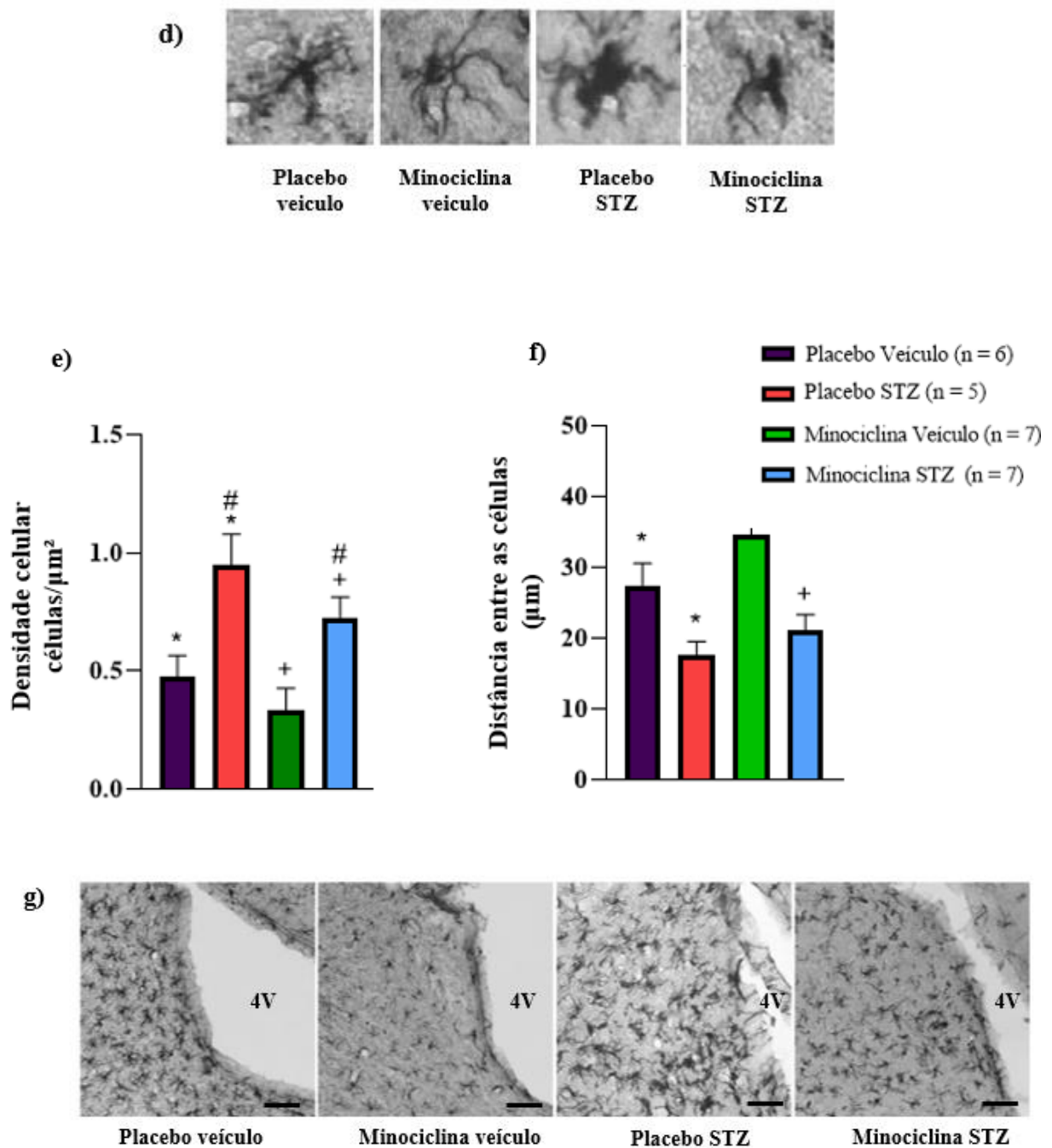


Figura 15. Efeito da administração intraperitoneal de minociclina (30 mg/kg) sobre A) Área da arborização B) área do corpo celular C) Índice morfológico D) Fotos da imuno-histoquímica mostrando o formato das células da micróglia E) Densidade celular F) Distância entre vizinhos (NND) G) Fotos da imuno-histoquímica (Iba-1), aumento 20x vezes, representando o efeito da administração intraperitoneal de minociclina (30 mg/kg) nas células da micróglia na região do *Locus coeruleus* nos grupos Placebo (Veículo e STZ) e Minociclina (Veículo e STZ). A barra de escala representa 100 μm. Os valores são expressos como média ± E.P.M. * indica diferença significativa entre as médias do grupo Placebo (veículo x STZ), + indica diferença significativa entre as médias do grupo Minociclina (veículo x STZ). # indica diferença do STZ Placebo x STZ minociclina

8. DISCUSSÃO

De forma geral, nós observamos que o tratamento por cinco dias consecutivos com minociclina atenuou os déficits cognitivos do modelo STZ (estreptozotocina) para DA. Nas células na micróglia foi observado que o tratamento também foi eficiente na inativação celular, reduzindo a densidade das células na região do *Locus coeruleus*, aumentando a área da ramificação e diminuindo a área do corpo celular no grupo Minociclina-STZ comparado com o grupo Placebo-STZ, o que reflete em um índice morfológico reduzido, indicando o retorno da micróglia na sua forma reativa. Não observamos alterações na distância entre cada célula (nnd) após o tratamento.

8.1- Efeito da administração de minociclina na aprendizagem e na memória espacial

O primeiro estudo que utilizou o tratamento com minociclina em modelo de DA em roedores foi conduzido por Hunter et al. (2004) induzido por injeções bilaterais no ventrículo cerebral da toxina de μ -p75-saporina. Os autores do estudo pioneiro com o fármaco observaram a melhora no comprometimento cognitivo dos animais acompanhado da inativação das células da micróglia, e redução da transcrição de mediadores pró-inflamatórios. De maneira similar, nós observamos que o tratamento com minociclina inativa as células da micróglia da região do *Locus coeruleus* e melhora a cognição no modelo para DA.

Os resultados do presente relatório demonstraram que a administração por cinco dias consecutivos de minociclina atenuaram os déficits de aprendizagem e memória espacial do nosso modelo STZ para DA (figura 14). Nós observamos que na fase de aquisição (aprendizagem) do labirinto de Barnes, a latência do grupo STZ-Minociclina para encontrar a caixa de escape no furo alvo foi menor que a do grupo STZ-Placebo (figura 14A). Essa latência para caixa de escape analisa aprendizagem e retenção de memória e foi melhorada pelo tratamento com minociclina. No dia teste, embora os animais STZ-Placebo mostrem-se aptos a encontrar o furo alvo, esses animais fazem um número significativamente menor de tentativas corretas no furo alvo do que os animais STZ-Minociclina (figura 14B). Novamente, os resultados sugerem que os animais STZ tratados com minociclina estão mais aptos em adquirir e/ou manter informações de referência espacial sobre a localização do furo alvo. Positivamente

os resultados do presente relatório se somam a literatura do potencial efeito da minociclina em atenuar o comprometimento cognitivo em roedores (BISCARO et al., 2012; CHOI et al., 2007; CUELLO et al., 2010; FERRETTI et al., 2012; GARCEZ et al., 2017; HUNTER et al., 2004; PARACHIKOVA et al., 2010; WANG et al., 2016). Contudo, SEABROOK et al. (2006) não observaram alterações nos déficits cognitivos de camundongos transgênicos idosos no modelo APP-tg para DA. Os autores administraram minociclina por 3 meses e atribuem o achado ao fato que, o tratamento com minociclina não foi capaz de reverter a deposição das placas beta-amilóide (β A) no modelo para DA e por essa razão os animais não apresentaram resultados na melhora ou na reversão dos problemas cognitivos (SEABROOK et al., 2006). Além disso, os mesmos autores também ressaltaram a hipótese que o efeito da minociclina pode depender dos estágios da DA, de tal maneira que, estágios mais avançados a intervenção com o fármaco pode não ser capaz de reverter as alterações moleculares e/ou cognitivas da doença. Neste cenário, nosso trabalho traz a primeira evidência do tratamento agudo de cinco dias com minociclina em restaurar a cognição em um modelo esporádico para DA, induzido pela ação da STZ (2 mg/kg).

Os estudos pré-clínicos que avaliaram o efeito da minociclina no desempenho cognitivo nos modelos para DA associaram o efeito benéfico do fármaco na diminuição dos processos inflamatórios mediados pela ativação da micróglia, e/ou pela redução na morte neuronal, e/ou pela redução dos principais biomarcadores da DA que potencializam o quadro neuroinflamatório presente na DA (proteína beta-amilóide (β A) e hiperfosforilação da proteína Tau) (BISCARO et al., 2012; FAMILIAN et al., 2006; GARCEZ et al., 2017; HUNTER et al., 2004; PARACHIKOVA et al., 2010; RYU et al., 2004). Nesse contexto, nossos dados se somam à literatura, uma vez que, os déficits cognitivos do nosso modelo podem estar associados à atividade microglial alterada. De fato, nossos dados demonstraram que no modelo para DA há um aumento da densidade celular (Figura 15e) e alteração na morfologia para a forma ativa “ameboide”, caracterizando um possível cenário neuroinflamatório. Nossa hipótese fortifica-se, pois ao realizarmos o tratamento com a minociclina, além dos animais STZ melhorarem a cognição, nós também observamos a diminuição da densidade celular microglial no grupo, bem como, as micróglias retornam para um estado em “repouso” caracterizado pela diminuição do corpo celular e aumento da arborização (Figura 15ab). Além disso, o índice morfológico (ID) foi menor no modelo após o tratamento com minociclina comparado ao grupo Placebo-STZ (figura 15c). Essa diminuição do ID confirma uma inativação microglial pelo tratamento com minociclina. De maneira similar, GARCIA-ALLOZA et al. (2007), não observaram redução

das placas beta amilóides após o tratamento com minociclina, mas observaram a redução da ativação microglial excessiva. FAN et al. (2007) demonstraram que o tratamento com minociclina não afetou os níveis ou deposição de β A cerebral, mas reduziu significativamente a ativação microglial e as citocinas pró-inflamatórias, sendo capaz de melhorar o desempenho comportamental de Tg- Camundongos SwDI. Juntos esses resultados apoiam a teoria de que a minociclina pode não reverter o acúmulo da β A na DA, mas prevenir a ativação microglial prejudicial.

Em conjunto com a literatura, nossos dados são os primeiros a apontar que a inativação das células da micróglia da região do *Locus coeruleus* melhora/restaura os problemas de memória e aprendizagem no nosso modelo esporádico para DA. Juntamente com o hipocampo e o córtex, o *Locus coeruleus* é uma região recrutada durante o processamento de memória e aprendizagem (LEMON et al., 2009; HANSEN & MANAHAN-VAUGHAN, 2015; NAKAHATA & YASUDA, 2018). De tal maneira que, falhas em suas conexões, e/ou alterações moleculares nos neurônios ou células da glia afetam diretamente a cognição (GANNON & WANG, 2019; GHOSH et al., 2019). Além disso, Theofilas et al (2017) demonstram que na escala de Braak a região do *Locus coeruleus* é a primeira a ser acometida pelos emaranhados neurofibrilares da proteína Tau. Frear a progressão da doença em estágios iniciais se tornou alvo dos estudos clínicos (KELLY et al., 2017; RORABAUGH et al., 2017). Dentro desse cenário clínico, o estudo das células da micróglia na região do LC, torna-se essencial, pois além de, promoverem a neuroinflamação na progressão da doença, as células da micróglia modulam plasticidade sináptica em estrutura e composição nos compartimentos pré e pós-sinápticos, que são fundamentais para a formação da memória (COOKE e BLISS, 2006; TREMBLAY et al., 2011; PARKHURST et al., 2015). Neste contexto, nossos dados fornecem evidências do uso da minociclina como uma abordagem farmacológica promissora para prevenir ou retardar os eventos moleculares patológicos que se refletem nos problemas fisiológicos e cognitivos na DA em estágios iniciais da doença.

9. CONCLUSÃO

A partir dos resultados adquiridos neste estudo, foi possível concluir que tratamento com minociclina por cinco dias consecutivos atenuou os déficits cognitivos do nosso modelo STZ (estreptozotocina) para a DA. De forma similar, mostramos que o tratamento com minociclina foi eficaz em diminuir a ativação da micróglia em um modelo de DA. Portanto, a

minociclina parece ser uma droga promissora no tratamento da neuroinflamação da DA causada pela ativação das células da micróglia.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZHEIMER A. UBER EINE EIGENARTIGE ERKRANKUNG DER HIRNRINDE. ALLG ZEITSCHRIFT PSYCHIATR 1907; 64: 146–148

ANSORG, A., BORNKESSEL, K., WITTE, O.W., URBACH, A. IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MULTIPLE LABELING WITH ANTIBODIES FROM THE SAME HOST SPECIES TO STUDY ADULT HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS. J. Vis. Exp. 1–13, 2015

BALDY, C., FOURNIER, S., BOISJOLY-VILLENEUVE, S., TREMBLAY, M.-È., KINKEAD, R. THE INFLUENCE OF SEX AND NEONATAL STRESS ON MEDULLARY MICRÓGLIA IN RAT PUPS. EXP. PHYSIOL. 103, 1192–1199, 2018.

BIANCARDI V, BÍCEGO KC, ALMEIDA MC, GARGAGLIONI LH. LOCUS COERULEUS NORADRENERGIC NEURONS AND CO₂ DRIVE TO BREATHING. PFLUGERS ARCH. MAR;455(6):1119-28, 2008

BISCARO B, LINDVALL O, TESCO G, EKDAHL CT, NITSCH RM. INHIBITION OF MICROGLIAL ACTIVATION PROTECTS HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS AND IMPROVES COGNITIVE DEFICITS IN A TRANSGENIC MOUSE MODEL FOR ALZHEIMER'S DISEASE. NEURODEGENER DIS. V. 9(4), P. 187-98, (2012).

BLACK, JOEL A.; LIU, SHUJUN; WAXMAN, STEPHEN G. SODIUM CHANNEL ACTIVITY MODULATES MULTIPLE FUNCTIONS IN MICRÓGLIA. GLIA, V. 57, N. 10, P. 1072-1081, 2009.

BROGDEN, R. N.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. MINOCYCLINE: A REVIEW OF ITS ANTIBACTERIAL AND PHARMACOKINETIC PROPERTIES AND THERAPEUTIC USE. DRUGS, V. 9, N. 4, P. 251-291, 1975.

BRUNO, MARTIN A. ET AL. AMYLOID B-INDUCED NERVE GROWTH FACTOR DYSMETABOLISM IN ALZHEIMER DISEASE. JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY & EXPERIMENTAL NEUROLOGY, V. 68, N. 8, P. 857-869, 2009.

BUDNI J, GARCEZ ML, DE MEDEIROS J, CASSARO E, SANTOS-BELLETTINI T, MINA F, QUEVEDO J. THE ANTI-INFLAMMATORY ROLE OF MINOCYCLINE IN ALZHEIMER S DISEASE. CURRENT ALZHEIMER RESEARCH. 2016

CHEN, A. ET AL. INDUCIBLE ENHANCEMENT OF MEMORY STORAGE AND SYNAPTIC PLASTICITY IN TRANSGENIC MICE EXPRESSING AN INHIBITOR OF ATF4 (CREB-2) AND C/EBP PROTEINS. NEURON, V. 39, N. 4, P. 655-669, 2003.

CHEN M, ONA VO, LI M, FERRANTE RJ, FINK KB, ZHU S, BIAN J, GUO L, FARRELL LA, HERSCH SM, HOBBS W, VONSATTEL JP, CHA JH, FRIEDLANDER RM.

MINOCYCLINE INHIBITS CASPASE-1 AND CASPASE-3 EXPRESSION AND DELAYS MORTALITY IN A TRANSGENIC MOUSE MODEL OF HUNTINGTON DISEASE. NATURE MEDICINE. v. 6(7), p. 797-801, 2000.

CHOI Y, KIM HS, SHIN KY, KIM EM, KIM M, KIM HS, PARK CH, JEONG YH, YOO J, LEE JP, CHANG KA, KIM S, SUH YH. MINOCYCLINE ATTENUATES NEURONAL CELL DEATH AND IMPROVES COGNITIVE IMPAIRMENT IN ALZHEIMER'S DISEASE MODELS. NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY: OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN COLLEGE OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY. v. 32(11), p. 2393-404, 2007.

COLTON, CAROL A.; WILCOCK, DONNA M. ASSESSING ACTIVATION STATES IN MICROGLIA. CNS & NEUROLOGICAL DISORDERS-DRUG TARGETS (FORMERLY CURRENT DRUG TARGETS-CNS & NEUROLOGICAL DISORDERS), v. 9, n. 2, p. 174-191, 2010.

COOKE, S. F.; BLISS, T. V. P. PLASTICITY IN THE HUMAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. BRAIN, v. 129, n. 7, p. 1659-1673, 2006.

CORREIA, S.C. ET AL. INSULIN-RESISTANT BRAIN STATE: THE CULPRIT IN SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE?. AGEING RES REV, v. 10, p. 264-273, 2011

CUELLO, A. C. ET AL. EARLY-STAGE INFLAMMATION AND EXPERIMENTAL THERAPY IN TRANSGENIC MODELS OF THE ALZHEIMER-LIKE AMYLOID PATHOLOGY. NEURODEGENERATIVE DISEASES. ANAIS...2010

DAVALOS, DIMITRIOS ET AL. ATP MEDIATES RAPID MICROGLIAL RESPONSE TO LOCAL BRAIN INJURY IN VIVO. NATURE NEUROSCIENCE, v. 8, n. 6, p. 752-758, 2005.

DAVOUST, NATHALIE ET AL. FROM BONE MARROW TO MICROGLIA: BARRIERS AND AVENUES. TRENDS IN IMMUNOLOGY, v. 29, n. 5, p. 227-234, 2008.

DEAN, O. M. ET AL. ADJUNCTIVE MINOCYCLINE TREATMENT FOR MAJOR DEPRESSIVE DISORDER: A PROOF OF CONCEPT TRIAL. AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND JOURNAL OF PSYCHIATRY, 2017.

DHEEN ST, KAUR C, LING EA. MICROGLIAL ACTIVATION AND ITS IMPLICATIONS IN THE BRAIN DISEASES. CURR MED CHEM 14(11): 1189-97 (2007).

DURSUN, ERDINÇ ET AL. THE INTERLEUKIN 1 ALPHA, INTERLEUKIN 1 BETA, INTERLEUKIN 6 AND ALPHA-2-MACROGLOBULIN SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH EARLY OR LATE ONSET ALZHEIMER'S DISEASE, MILD COGNITIVE IMPAIRMENT OR PARKINSON'S DISEASE. JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, v. 283, p. 50-57, 2015.

FAN, RONG ET AL. MINOCYCLINE REDUCES MICROGLIAL ACTIVATION AND IMPROVES BEHAVIORAL DEFICITS IN A TRANSGENIC MODEL OF CEREBRAL MICROVASCULAR AMYLOID. JOURNAL OF NEUROSCIENCE, v. 27, n. 12, p. 3057-3063, 2007.

FERRETTI, M. T. ET AL. MINOCYCLINE CORRECTS EARLY, PRE-PLAQUE NEUROINFLAMMATION AND INHIBITS BACE-1 IN A TRANSGENIC MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE-LIKE AMYLOID PATHOLOGY. JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION, 2012.

GANNON, MARY; WANG, QIN. COMPLEX NORADRENERGIC DYSFUNCTION IN ALZHEIMER'S DISEASE: LOW NOREPINEPHRINE INPUT IS NOT ALWAYS TO BLAME. *BRAIN RESEARCH*, v. 1702, p. 12-16, 2019.

GARCIA-ALLOZA, M. ET AL. A LIMITED ROLE FOR MICRÓGLIA IN ANTIBODY MEDIATED PLAQUE CLEARANCE IN APP MICE. *NEUROBIOLOGY OF DISEASE*, 2007.

GARCEZ, M. L. ET AL. MINOCYCLINE REDUCES INFLAMMATORY PARAMETERS IN THE BRAIN STRUCTURES AND SERUM AND REVERSES MEMORY IMPAIRMENT CAUSED BY THE ADMINISTRATION OF AMYLOID B (1-42) IN MICE. *PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY AND BIOLOGICAL PSYCHIATRY*, 2017.

GARGAGLIONI, L.H.; HARTZLER, L.K.; PUTNAM, R.W. THE LOCUS COERULEUS AND CENTRAL CHEMOSENSITIVITY. *RESPIR PHYSIOL NEUROBIOL.* v. 173, p. 264-273, 2010.

GARRIDO-MESA N, ZARZUELO A, GÁLVEZ J. MINOCYCLINE: FAR BEYOND NA ANTIBIOTIC. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY.* v. 169(2), p. 337-52, 2013.

GHOSH, HS. ADULT NEUROGENESIS AND THE PROMISE OF ADULT NEURAL STEM CELLS. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL NEUROSCIENCE*, v. 13, p. 1179069519856876, 2019.

GOEDERT M, CROWTHER RA, GARNER CC. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS TAU AND MAP2. *TRENDS NEUROSCI* 1991; 14: 193-9

GOULDEN, V.; GLASS, D.; CUNLIFFE, W. J. SAFETY OF LONG-TERM HIGH-DOSE MINOCYCLINE IN THE TREATMENT OF ACNE. *BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY*, 1996.

GRAEBER, M.B.; STREIT, W. J. MICRÓGLIA: BIOLOGY AND PATHOLOGY. *ACTA NEUROPATHOLOGICA*, v. 119, n. 1, p. 89-105, 2010.

GROUP HS. MINOCYCLINE SAFETY AND TOLERABILITY IN HUNTINGTON DISEASE. *NEUROLOGY*. 2004;63(3):547-9.

GRUNBLATT E, HOYER S, RIEDERER P. GENE EXPRESSION PROFILE IN STREPTOZOTOCIN RAT MODEL FOR SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE. *J NEURAL TRANSM* 111:367–386, 2004

GUERRIERO, F., SGARLATA, C., FRANCIS, M., MAURIZI, N., FARAGLI, A., PERNA, S., ... RICEVUTI, G. NEUROINFLAMMATION, IMMUNE SYSTEM AND ALZHEIMER DISEASE: SEARCHING FOR THE MISSING LINK. *AGING CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH.* v. 29(5), p. 821–831, 2016

FAGUNDES, S.D ET AL. PREVALENCE OF DEMENTIA AMONG ELDERLY BRAZILIANS: A SYSTEMATIC REVIEW. *SAO PAULO MEDICAL JOURNAL*, v. 129, n. 1, p. 46-50, 2011.

FAMILIAN, A. ET AL. INHIBITORY EFFECT OF MINOCYCLINE ON AMYLOID B FIBRIL FORMATION AND HUMAN MICROGLIAL ACTIVATION. *GLIA*, 2006.

HABIB, PARDES; BEYER, CORDIAN. REGULATION OF BRAIN MICROGLIA BY FEMALE GONADAL STEROIDS. THE JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, v. 146, p. 3-14, 2015.

HALLIDAY G, ROBINSON SR, SHEPHERD C, KRIL J. ALZHEIMER'S DISEASE AND INFLAMMATION: A REVIEW OF CELLULAR AND THERAPEUTIC MECHANISMS. CLIN EXP PHARMACOL PHYSIOL. 2000;27:1-8.

HANISCH, UWE-KARSTEN; KETTENMANN, HELMUT. MICROGLIA: ACTIVE SENSOR AND VERSATILE EFFECTOR CELLS IN THE NORMAL AND PATHOLOGIC BRAIN. NATURE NEUROSCIENCE, v. 10, n. 11, p. 1387-1394, 2007.

HANSEN, NIELS; MANAHAN-VAUGHAN, DENISE. LOCUS COERULEUS STIMULATION FACILITATES LONG-TERM DEPRESSION IN THE DENTATE GYRUS THAT REQUIRES ACTIVATION OF B-ADRENERGIC RECEPTORS. CEREBRAL CORTEX, v. 25, n. 7, p. 1889-1896, 2015.

HARDING, H.P. ET AL. REGULATED TRANSLATION INITIATION CONTROLS STRESS-INDUCED GENE EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS. MOLECULAR CELL, v. 6, n. 5, p. 1099-1108, 2000.

HARRIS, J.R. PROTEIN AGGREGATION AND FIBRILLOGENESIS IN CEREBRAL AND SYSTEMIC AMYLOID DISEASE, EDITION 2012.

HARMAN, D. A HYPOTHESIS ON THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE. ANN NY, v. 786, p. 152-68, 1996.

HENEKA M.T., CARSON M. J., KHOURY J. E., LANDRETH G. E., BROSSERON F., FEINSTEIN D. L., ET AL. NEUROINFLAMMATION IN ALZHEIMER'S DISEASE. LANCET NEUROL. 14, 388-405, 2015.

HENEKA M.T, O'BANION MK. INFLAMMATORY PROCESSES IN ALZHEIMER'S DISEASE. J NEUROIMMUNOL 184:69-91, 2017

HENSLEY K. NEUROINFLAMMATION IN ALZHEIMER'S DISEASE: MECHANISMS, PATHOLOGIC CONSEQUENCES, AND POTENTIAL FOR THERAPEUTIC MANIPULATION. J ALZHEIMERS Dis. v. 21: p, 1- 14, 2010.

HEO, HO JIN; LEE, CHANG YONG. PHENOLIC PHYTOCHEMICALS IN CABBAGE INHIBIT AMYLOID B PROTEIN-INDUCED NEUROTOXICITY. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 39, n. 4, p. 331-337, 2006.

HEPPNER FL, RANSOHOFF RM, BECHER B. IMMUNE ATTACK: THE ROLE OF INFLAMMATION IN ALZHEIMER DISEASE. NAT REV NEUROSCI. v. 16(6), p. 358-72, 2015

HIRSCH, E. C. ET AL. THE ROLE OF DIAL REACTION AND INFLAMMATION IN PARKINSON'S DISEASE. DOCUMENTATION PAGE, v. 991, p. 214-228, 2003.

HOYER S, LANNERT H. LONG-TERM ABNORMALITIES IN BRAIN GLUCOSE/ENERGY METABOLISM AFTER INHIBITION OF THE NEURONAL INSULIN RECEPTOR: IMPLICATION OF TAU-PROTEIN. J. NEURAL TRANSM. SUPPL, PP. 195-202, 2007.

HUNTER CL, QUINTERO EM, GILSTRAP L, BHAT NR, GRANHOLM AC. MINOCYCLINE PROTECTS BASAL FOREBRAIN CHOLINERGIC NEURONS FROM MU P75- SAPORIN IMMUNOTOXIC LESIONING. THE EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE. V. 19(12), P 3305-16, 2004.

IRVINE, G. BRENT ET AL. PROTEIN AGGREGATION IN THE BRAIN: THE MOLECULAR BASIS FOR ALZHEIMER'S AND PARKINSON'S DISEASES. MOLECULAR MEDICINE, V. 14, N. 7, P. 451-464, 2008.

KAR, S.; SLOWIKOWSKI, S.P.; WESTAWAY, D.; MOUNT, H.T. INTERACTIONS BETWEEN BETA-AMYLOID AND CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE. J PSYCHIATRY NEUROSCI, V. 29(6), P. 427-41, 2004.

KAUR D, SHARMA V, DESHMUKH R. ACTIVATION OF MICROGLIA AND ASTROCYTES: A ROADWAY TO NEUROINFLAMMATION AND ALZHEIMER'S DISEASE. INFLAMMOPHARMACOLOGY. 2019 MAR 14.

KELLY, SARAH C. ET AL. LOCUS COERULEUS CELLULAR AND MOLECULAR PATHOLOGY DURING THE PROGRESSION OF ALZHEIMER'S DISEASE. ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS, V. 5, N. 1, P. 1-14, 2017.

K.G. MAWUENYEGA, W. SIGURDSON, V. OVOD, L. MUNSELL, T. KASTEN, J.C. MORRIS, K.E. YARASHESKI, R.J. BATEMAN, DECREASED CLEARANCE OF CNS BETA-AMYLOID IN ALZHEIMER'S DISEASE, SCIENCE 330 (6012) (2010) 1774.

KIELIAN T, ESEN N, LIU S, PHULWANI NK, SYED MM, PHILLIPS N, NISHINA K, CHEUNG AL, SCHWARTZMAN JD, RUHE JJ. MINOCYCLINE MODULATES NEUROINFLAMMATION INDEPENDENTLY OF ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS-INDUCED BRAIN ABSCESS. THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. V. 171(4), P. 1199- 214, 2007

KORZHEVSKII, D.E., KIRIK, O. V. BRAIN MICROGLIA AND MICROGLIAL MARKERS. NEUROSCI. BEHAV. PHYSIOL, 2016

KRAFT, ANDREW D.; HARRY, G. JEAN. FEATURES OF MICROGLIA AND NEUROINFLAMMATION RELEVANT TO ENVIRONMENTAL EXPOSURE AND NEUROTOXICITY. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH, V. 8, N. 7, P. 2980-3018, 2011.

KRIZ, JASNA; NGUYEN, MINH DANG; JULIEN, JEAN-PIERRE. MINOCYCLINE SLOWS DISEASE PROGRESSION IN A MOUSE MODEL OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. NEUROBIOLOGY OF DISEASE, V. 10, N. 3, P. 268-278, 2002.

KREUTZBERG, GEORG W. MICROGLIA: A SENSOR FOR PATHOLOGICAL EVENTS IN THE CNS. TRENDS IN NEUROSCIENCES, V. 19, N. 8, P. 312-318, 1996.

KUANG X, SCOFIELD VL, YAN M, STOICA G, LIU N, WONG PK. ATTENUATION OF OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND APOPTOSIS BY MINOCYCLINE PREVENTS RETROVIRUS-INDUCED NEURODEGENERATION IN MICE. *BRAIN RESEARCH*. v. 1286, p. 174-84, 2009

KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A REVIEW ON ALZHEIMER'S DISEASE PATHOPHYSIOLOGY AND ITS MANAGEMENT: AN UPDATE. *PHARMACOLOGICAL REPORTS*, 2015.

KUMMER, MARKUS P. ET AL. NITRATION OF TYROSINE 10 CRITICALLY ENHANCES AMYLOID B AGGREGATION AND PLAQUE FORMATION. *NEURON*, v. 71, n. 5, p. 833-844, 2011.

LAFERLA, FRANK M.; GREEN, KIM N. ANIMAL MODELS OF ALZHEIMER DISEASE. *COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN MEDICINE*, v. 2, n. 11, p. A006320, 2012.

LASAGNA-REEVES CA, GLABE CG, KAYED R. AMYLOID-B ANNULAR PROTOfIBRILS EVADE FIBRILLAR FATE IN ALZHEIMER DISEASE BRAIN. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. v. 286(25), p. 22122-30, 2011

LATTA CH, SUDDUTH TL, WEEKMAN EM, BROTHERS HM, ABNER EL, POPA GJ, MENDENHALL MD, GONZALEZ-OREGON F, BRAUN K, WILCOCK DM. DETERMINING THE ROLE OF IL-4 INDUCED NEUROINFLAMMATION IN MICROGLIAL ACTIVITY AND AMYLOID-BETA USING BV2 MICROGLIAL CELLS AND APP/PS1 TRANSGENIC MICE. *JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION*. v. 12(1):243, 2015

LAWSON, LINDA J. ET AL. HETEROGENEITY IN THE DISTRIBUTION AND MORPHOLOGY OF MICROGLIA IN THE NORMAL ADULT MOUSE BRAIN. *NEUROSCIENCE*, v. 39, n. 1, p. 151-170, 1990.

LEE, VIRGINIA M. ET AL. A68: A MAJOR SUBUNIT OF PAIRED HELICAL FILAMENTS AND DERIVATIZED FORMS OF NORMAL TAU. *SCIENCE*, v. 251, n. 4994, p. 675-678, 1991.

LEMON, NEAL ET AL. LOCUS COERULEUS ACTIVATION FACILITATES MEMORY ENCODING AND INDUCES HIPPOCAMPAL LTD THAT DEPENDS ON B-ADRENERGIC RECEPTOR ACTIVATION. *CEREBRAL CORTEX*, v. 19, n. 12, p. 2827-2837, 2009.

LIMA-SILVEIRA, L. ET AL. ENHANCEMENT OF EXCITATORY TRANSMISSION IN NTS NEURONS PROJECTING TO VENTRAL MEDULLA OF RATS EXPOSED TO SUSTAINED HYPOXIA IS BLUNTED BY MINOCYCLINE. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY*, 2019.

LINDEBOOM, J.; WEINSTEIN, H. NEUROPSYCHOLOGY OF COGNITIVE AGEING, MINIMAL COGNITIVE IMPAIRMENT, ALZHEIMER'S DISEASE, AND VASCULAR COGNITIVE IMPAIRMENT. *EUR J PHARMACOL*. 2004; 490(1-3):83-6.

LOVESTONE, SIMON; ANDERTON, BRIAN. CYTOSKELETAL ABNORMALITIES IN ALZHEIMER'S DISEASE. *CURRENT OPINION IN NEUROLOGY AND NEUROSURGERY*, v. 5, n. 6, p. 883-888, 1992.

MASGRAU, ROSER ET AL. SHOULD WE STOP SAYING 'GLIA' AND 'NEUROINFLAMMATION'? *TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE*, v. 23, n. 6, p. 486-500, 2017.

MCKEE, A. C.; KOSIK, K. S.; KOWALL, N. W. NEURITIC PATHOLOGY AND DEMENTIA IN ALZHEIMER'S DISEASE. ANNALS OF NEUROLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN NEUROLOGICAL ASSOCIATION AND THE CHILD NEUROLOGY SOCIETY, v. 30, n. 2, p. 156-165, 1991.

MCGEER, PL. ET AL. REACTIVE MICROGLIA ARE POSITIVE FOR HLA-DR IN THE SUBSTANTIA NIGRA OF PARKINSON'S AND ALZHEIMER'S DISEASE BRAINS. NEUROLOGY, v. 38, n. 8, p. 1285-1285, 1988.

MCGEER PL, MCGEER EG. THE AMYLOID CASCADE-INFLAMMATORY HYPOTHESIS OF ALZHEIMER DISEASE: IMPLICATIONS FOR THERAPY. ACTA NEUROPATHOL. v. 126, p. 479-497, 2013.

MEJIA, R.O. SANCHEZ ET AL. MINOCYCLINE REDUCES TRAUMATIC BRAIN INJURY-MEDIATED CASPASE-1 ACTIVATION, TISSUE DAMAGE, AND NEUROLOGICAL DYSFUNCTION. NEUROSURGERY, v. 48, n. 6, p. 1393-1401, 2001.

MINTER MR, TAYLOR JM, CRACK PJ. THE CONTRIBUTION OF NEUROINFLAMMATION TO AMYLOID TOXICITY IN ALZHEIMER'S DISEASE. J NEUROCHEM. v. 136, p. 457-474, 2016

MIYAMOTO, A. ET AL. MICROGLIA CONTACT INDUCES SYNAPSE FORMATION IN DEVELOPING SOMATOSENSORY CORTEX. NATURE COMMUNICATIONS, 2016.

NAGAI, A. ET AL. GENERATION AND CHARACTERIZATION OF IMMORTALIZED HUMAN MICROGLIAL CELL LINES: EXPRESSION OF CYTOKINES AND CHEMOKINES. NEUROBIOLOGY OF DISEASE, v. 8, n. 6, p. 1057-1068, 2001.

NAKAGAWA, YUTAKA; CHIBA, KENJI. DIVERSITY AND PLASTICITY OF MICROGLIAL CELLS IN PSYCHIATRIC AND NEUROLOGICAL DISORDERS. PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, v. 154, p. 21-35, 2015.

NAKAHATA, YOSHIHISA; YASUDA, RYOHEI. PLASTICITY OF SPINE STRUCTURE: LOCAL SIGNALING, TRANSLATION AND CYTOSKELETAL REORGANIZATION. FRONTIERS IN SYNAPTIC NEUROSCIENCE, v. 10, p. 29, 2018.

NIMMERJAHN, AXEL; KIRCHHOFF, FRANK; HELMCHEN, FRITJOF. RESTING MICROGLIAL CELLS ARE HIGHLY DYNAMIC SURVEILLANTS OF BRAIN PARENCHYMA IN VIVO. SCIENCE, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005.

NITTA, ATSUMI ET AL. CONTINUOUS INFUSION OF B-AMYLOID PROTEIN INTO THE RAT CEREBRAL VENTRICLE INDUCES LEARNING IMPAIRMENT AND NEURONAL AND MORPHOLOGICAL DEGENERATION. THE JAPANESE JOURNAL OF PHARMACOLOGY, v. 73, n. 1, p. 51-57, 1997.

NIZAMI, S; HALL-ROBERTS, H; WARRIER, S; COWLEY, SA; DI DANIEL, E.BR. MICROGLIAL INFLAMMATION AND PHAGOCYTOSIS IN ALZHEIMER'S DISEASE: POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS. J PHARMACOL. 2019.

NOBLE W, GARWOOD C, STEPHENSON J, KINSEY AM, HANGER DP, ANDERTON BH. MINOCYCLINE REDUCES THE DEVELOPMENT OF ABNORMAL TAU SPECIES IN MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE. FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY. v. 23(3), p. 739-50, 2009

PARACHIKOVA A, VASILEVKO V, CRIBBS DH, LAFERLA FM, GREEN KN. REDUCTIONS IN AMYLOID-BETA-DERIVED NEUROINFLAMMATION, WITH MINOCYCLINE, RESTORE COGNITION BUT DO NOT SIGNIFICANTLY AFFECT TAU HYPERPHOSPHORYLATION. JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE : JAD. v. 21(2), p. 527-42, 2010

PARKHURST, DAVID L.; WISSMEIER, LAURIN. PHREEQCRM: A REACTION MODULE FOR TRANSPORT SIMULATORS BASED ON THE GEOCHEMICAL MODEL PHREEQC. ADVANCES IN WATER RESOURCES, v. 83, p. 176-189, 2015.

PAXINOS, G.; WATSON, C. THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES, ED 6. AMSTERDAM: ACADEMIC. 2007.

PERLMUTTER, L. S. ET AL. MHC CLASS II-POSITIVE MICROGLIA IN HUMAN BRAIN: ASSOCIATION WITH ALZHEIMER LESIONS. JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, v. 33, n. 4, p. 549-558, 1992.

PINTO, M.F ET AL. QUALIDADE DE VIDA DE CUIDADORES DE IDOSOS COM DOENÇA DE ALZHEIMER. ACTA PAULISTA DE ENFERMAGEM, v. 22, n. 5, p. 652-657, 2009.

POE, GINA R. ET AL. LOCUS COERULEUS: A NEW LOOK AT THE BLUE SPOT. NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE, v. 21, n. 11, p. 644-659, 2020.

POPOVIC, NATALIJA ET AL. INHIBITION OF AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS BY A TETRACYCLINE. ANNALS OF NEUROLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN NEUROLOGICAL ASSOCIATION AND THE CHILD NEUROLOGY SOCIETY, v. 51, n. 2, p. 215-223, 2002.

PRINCE, M. J. ET AL., WORLD ALZHEIMER REPORT 2016 - IMPROVING HEALTHCARE FOR PEOPLE LIVING WITH DEMENTIA: COVERAGE, QUALITY AND COSTS NOW AND IN THE FUTURE. ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. LONDON, p.131, 2016.

QIU, Y. ET AL. COGNITIVE HETEROGENEITY IN PROBABLE ALZHEIMER DISEASE: CLINICAL AND NEUROPATHOLOGIC FEATURES. NEUROLOGY, 2019.

RAI S; KAMAT P.K; NATH C, SHUKLA R. GLIAL ACTIVATION AND POST-SYNAPTIC NEUROTOXICITY: THE KEY EVENTS IN STREPTOZOTOCIN (ICV) INDUCED MEMORY IMPAIRMENT IN RATS. PHARMACOL. BIOCHEM. BEHAV., 117 (2014), 2014.

RIBEIRO, P.C.C, DE SOUZA LOPES, C; LOURENÇO, R.A. PREVALENCE OF DEMENTIA IN ELDERLY CLIENTS OF A PRIVATE HEALTH CARE PLAN: A STUDY OF THE FIBRA-RJ, BRAZIL. DEMENTIA AND GERIATRIC COGNITIVE DISORDERS, v. 35, n. 1-2, p. 77-86, 2013.

RODRIGUES, L, ET AL. HIPPOCAMPAL ALTERATIONS IN RATS SUBMITTED TO STREPTOZOTOCIN-INDUCED DEMENTIA MODEL ARE PREVENTED BY AMINOGUANIDINE. *J ALZHEIMERS Dis*, 17:193-202, 2009

RORABAUGH, JACKI M. ET AL. CHEMOGENETIC LOCUS COERULEUS ACTIVATION RESTORES REVERSAL LEARNING IN A RAT MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE. *BRAIN*, v. 140, n. 11, p. 3023-3038, 2017.

RUBEN, G. C. ET AL. THE MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TAU FORMS A TRIPLE-STRANDED LEFT-HAND HELICAL POLYMER. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, v. 266, n. 32, p. 22019-22027, 1991.

RYU, J. K. ET AL. MINOCYCLINE INHIBITS NEURONAL DEATH AND GLIAL ACTIVATION INDUCED BY BAMYLOID PEPTIDE IN RAT HIPPOCAMPUS. *GLIA*, 2004.

SALKOVIC-PETRISIC, MELITA ET AL. WHAT HAVE WE LEARNED FROM THE STREPTOZOTOCIN-INDUCED ANIMAL MODEL OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE, ABOUT THE THERAPEUTIC STRATEGIES IN ALZHEIMER'S RESEARCH. *JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION*, v. 120, n. 1, p. 233-252, 2013.

SCHELTENS P., BLENNOW K., BRETHER M.M., DE STROOPER B., FRISONI G.B., SALLOWAY S., VAN DER FLIER W.M. ALZHEIMER'S DISEASE. *LANCET*. v. 388, p. 505–517, 2016

SCHIEVEN GL. THE BIOLOGY OF P38 KINASE: A CENTRAL ROLE IN INFLAMMATION. *CURR TOP MED CHEM*. v. 5(10): p. 921-8, 20075

SCHINDELIN, JOHANNES ET AL. FIJI: AN OPEN-SOURCE PLATFORM FOR BIOLOGICAL-IMAGE ANALYSIS. *NATURE METHODS*, v. 9, n. 7, p. 676-682, 2012.

SCHMIDT, REINHOLD ET AL. EFNS-ENS/EAN GUIDELINE ON CONCOMITANT USE OF CHOLINESTERASE INHIBITORS AND MEMANTINE IN MODERATE TO SEVERE ALZHEIMER'S DISEASE. *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY*, v. 22, n. 6, p. 889-898, 2015.

SCHWAB C, MCGEER PL. INFLAMMATORY ASPECTS OF ALZHEIMER DISEASE AND OTHER NEURODEGENERATIVE DISORDERS. *J ALZHEIMERS Dis*. 2008;13:359–369.

SEABROOK, TIMOTHY J. ET AL. MINOCYCLINE AFFECTS MICROGLIA ACTIVATION, AB DEPOSITION, AND BEHAVIOR IN APP-TG MICE. *GLIA*, v. 53, n. 7, p. 776-782, 2006.

SELKOE, DENNIS J. ALZHEIMER'S DISEASE: GENES, PROTEINS, AND THERAPY. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, 2001.

SERRANO-POZO A, FROSCHE MP, MASLIAH E, HYMAN BT. NEUROPATHOLOGICAL ALTERATIONS IN ALZHEIMER DISEASE. *COLD SPRING HARB PERSPECT MED*. 2011.

SHADFAR S, HWANG CJ, LIM MS, CHOI DY, HONG JT. INVOLVEMENT OF INFLAMMATION IN ALZHEIMER'S DISEASE PATHOGENESIS AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF ANTIINFLAMMATORY AGENTS. *ARCH PHARM RES*. v. 38, p. 2106–2119, 2015.

SHAMIM D, LASKOWSKI M. INHIBITION OF INFLAMMATION MEDIATED THROUGH THE TUMOR NECROSIS FACTOR A BIOCHEMICAL PATHWAY CAN LEAD TO FAVORABLE OUTCOMES IN ALZHEIMER DISEASE. *J CENT NERV SYST DIS.* v. 28;9, 2017

SHANKAR, GANESH M. ET AL. AMYLOID-B PROTEIN DIMERS ISOLATED DIRECTLY FROM ALZHEIMER'S BRAINS IMPAIR SYNAPTIC PLASTICITY AND MEMORY. *NATURE MEDICINE*, v. 14, n. 8, p. 837-842, 2008.

SHARMA, SUNITA; RAKOCZY, SHARLENE; BROWN-BORG, HOLLY. ASSESSMENT OF SPATIAL MEMORY IN MICE. *LIFE SCIENCES*, v. 87, n. 17-18, p. 521-536, 2010.

SILVA, T. M. ET AL. MINOCYCLINE ALTERS EXPRESSION OF INFLAMMATORY MARKERS IN AUTONOMIC BRAIN AREAS AND VENTILATORY RESPONSES INDUCED BY ACUTE HYPOXIA. *EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY*, 2018.

STEWART, CAMERON R. ET AL. CD36 LIGANDS PROMOTE STERILE INFLAMMATION THROUGH ASSEMBLY OF A TOLL-LIKE RECEPTOR 4 AND 6 HETERODIMER. *NATURE IMMUNOLOGY*, v. 11, n. 2, p. 155, 2010.

STOWELL, R.D., WONG, E.L., BATCHELOR, H.N., MENDES, M.S., LAMANTIA, C.E., WHITELAW, B.S., MAJEWSKA, A.K. CEREBELLAR MICRÓGLIA ARE DYNAMICALLY UNIQUE AND SURVEY PURKINJE NEURONS IN VIVO. *DEV. NEUROBIOL.* 78, 627–644, 2018.

TAYLOR, S.S.; HASTE, NM.; GHOSH, G. PKR AND EIF2A: INTEGRATION OF KINASE DIMERIZATION, ACTIVATION, AND SUBSTRATE DOCKING. *CELL*, v. 122, n. 6, p. 823-825, 2005.

TAYLOR, S.E. ET AL. ROD MICRÓGLIA: A MORPHOLOGICAL DEFINITION. *PLOS ONE*, v. 9, n. 5, p. e97096, 2014.

TEIXEIRA, J.B ET AL. DOENÇA DE ALZHEIMER: ESTUDO DA MORTALIDADE NO BRASIL, 2000-2009. *CADERNOS DE SAÚDE PÚBLICA*, v. 31, p. 850-860, 2015.

TENORIO-LOPES, L., BALDY, C., JOCHMANS-LEMOINE, A., MERCIER, O., POTHIER-PICCININ, O., SEABORN, T., JOSEPH, V., MARC, I., KINKEAD, R., 2017. CONSEQUENCES OF MATERNAL OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID SUPPLEMENTATION ON RESPIRATORY FUNCTION IN RAT PUPS. *J. PHYSIOL.* 595, 1637–1655.

THEOFILAS, PANOS ET AL. LOCUS COERULEUS VOLUME AND CELL POPULATION CHANGES DURING ALZHEIMER'S DISEASE PROGRESSION: A STEREOLOGICAL STUDY IN HUMAN POSTMORTEM BRAINS WITH POTENTIAL IMPLICATION FOR EARLY-STAGE BIOMARKER DISCOVERY. *ALZHEIMER'S & DEMENTIA*, v. 13, n. 3, p. 236-246, 2017.

TIKKA T, FIEBICH BL, GOLDSTEINS G, KEINANEN R, KOISTINAHO J. MINOCYCLINE, A TETRACYCLINE DERIVATIVE, IS NEUROPROTECTIVE AGAINST EXCITOTOXICITY BY INHIBITING ACTIVATION AND PROLIFERATION OF MICRÓGLIA. *THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE: THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE.* v. 21(8), p 2580-8, 2001.

TIKKA, TIINA M.; KOISTINAHO, JARI E. MINOCYCLINE PROVIDES NEUROPROTECTION AGAINST N-METHYL-D-ASPARTATE NEUROTOXICITY BY INHIBITING MICRÓGLIA. *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, v. 166, n. 12, p. 7527-7533, 2001.

TOTA S, AWASTHI H, KAMAT PK, NATH C, HANIF K. PROTECTIVE EFFECT OF QUERCETIN AGAINST INTRACEREBRAL STREPTOZOTOCIN INDUCED REDUCTION IN CEREBRAL BLOOD FLOW AND IMPAIRMENT OF MEMORY IN MICE. *BEHAV BRAIN RES* 209:73–79, 2010

TREMBLAY, MARIE-ÈVE; LOWERY, REBECCA L.; MAJEWSKA, ANIA K. MICROGLIAL INTERACTIONS WITH SYNAPSES ARE MODULATED BY VISUAL EXPERIENCE. *PLOS BIOL*, v. 8, n. 11, p. e1000527, 2010.

TREMBLAY, MARIE-ÈVE ET AL. THE ROLE OF MICRÓGLIA IN THE HEALTHY BRAIN. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*, v. 31, n. 45, p. 16064-16069, 2011.

VAN ROSSUM, DENISE; HANISCH, UWE-KARSTEN. MICRÓGLIA. *METABOLIC BRAIN DISEASE*, v. 19, n. 3, p. 393-411, 2004.

VERDONK, FRANCK ET AL. PHENOTYPIC CLUSTERING: A NOVEL METHOD FOR MICROGLIAL MORPHOLOGY ANALYSIS. *JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION*, v. 13, n. 1, p. 153, 2016.

VICENTE, M.C.; DIAS, M.B.; FONSECA, E.M.; BÍCEGO, K.C; GARGAGLIONI, L.H. OREXINERGIC SYSTEM IN THE LOCUS COERULEUS MODULATES THE CO₂ VENTILATORY RESPONSE. *PFLUGERS ARCH*, 2016.

VICENTE, MC; ALMEIDA, MC; BÍCEGO, KC; CARRETTIERO, DC; GARGAGLIONI LH. HYPERCAPNIC AND HYPOXIC RESPIRATORY RESPONSE DURING WAKEFULNESS AND SLEEP IN A STREPTOZOTOCIN MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE IN RATS. *J ALZHEIMERS DIS*. v. 65(4), p. 1159-1174, 2018

VILLEMAGNE, V. L. ET AL. ABETA-AMYLOID AND TAU IMAGING IN DEMENTIA. *SEMIN NUCL MED*, v. 47, n. 1, p. 75-88, JAN 2017.

VIVIEN, DENIS; BUISSON, ALAIN. SERINE PROTEASE INHIBITORS: NOVEL THERAPEUTIC TARGETS FOR STROKE? *JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW & METABOLISM*, v. 20, n. 5, p. 755-764, 2000.

WANG, XIN ET AL. MINOCYCLINE INHIBITS CASPASE-INDEPENDENT AND-DEPENDENT MITOCHONDRIAL CELL DEATH PATHWAYS IN MODELS OF HUNTINGTON'S DISEASE. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, v. 100, n. 18, p. 10483-10487, 2003.

WANG, H. L. ET AL. MINOCYCLINE ATTENUATES POST-OPERATIVE COGNITIVE IMPAIRMENT IN AGED MICE BY INHIBITING MICRÓGLIA ACTIVATION. *JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE*, 2016.

WILSON, ROBERT S. ET AL. NEURAL RESERVE, NEURONAL DENSITY IN THE LOCUS CERULEUS, AND COGNITIVE DECLINE. *NEUROLOGY*, v. 80, n. 13, p. 1202-1208, 2013.

WIRZ, K.T.; KEITEL, S.; SWAAB, D.F.; VERHAAGEN, J.; BOSSERS, K. EARLY MOLECULAR CHANGES IN ALZHEIMER DISEASE: CAN WE CATCH THE DISEASE IN ITS PRESYMPTOMATIC PHASE? *J ALZHEIMER'S Dis.* 38 (4), 719–740, 2014.

WU, DC; JACKSON-LEWIS, V; VILA, M; TIEU, K; TEISMANN, P; VADSETH, C; CHOI, DK; ISCHIROPOULOS, H; PRZEDBORSKI S. BLOCKADE OF MICROGLIAL ACTIVATION IS NEUROPROTECTIVE IN THE 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE MOUSE MODEL OF PARKINSON DISEASE. *THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE: THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE.* v. 22(5), p. 1763-71, 2002.

YRJÄNHEIKKI, JUHA ET AL. A TETRACYCLINE DERIVATIVE, MINOCYCLINE, REDUCES INFLAMMATION AND PROTECTS AGAINST FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA WITH A WIDE THERAPEUTIC WINDOW. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, v. 96, n. 23, p. 13496-13500, 1999.

ZHU S, STAVROVSKAYA IG, DROZDA M, KIM BY, ONA V, LIM, SARANG S, LIU AS, HARTLEY DM, WU DC, GULLANS S, FERRANTE RJ, PRZEDBORSKI S, KRISTAL BS, FRIEDLANDER RM. MINOCYCLINE INHIBITS CYTOCHROME C RELEASE AND DELAYS PROGRESSION OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS IN MICE. *NATURE.* v. 417(6884), p. 74- 8, 2002