

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

MARINA ZANICHELLI BARBOSA

MODULAÇÃO MICROGLIAL NA DOENÇA DE ALZHEIMER

BOTUCATU

2016

Marina Zanichelli Barbosa

MODULAÇÃO MICROGLIAL NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biomédicas, da Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho” como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto

Co-orientadora: Luciana Paroneto Medina

BOTUCATU

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Barbosa, Marina Zanichelli.

Ativação microglial na Doença de Alzheimer / Marina Zanichelli Barbosa. - Botucatu, 2016

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Roberto Giorgetti de Britto
Coorientador: Luciana Paroneto Medina
Capes: 20702019

1. Alzheimer, Doença de. 2. Cérebro - Doenças. 3. Microglia. 4. Camundongo como animal de laboratório.

Palavras-chave: Alzheimer; Camundongo 3xTg AD; Microglia; Neurodegeneração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo incentivo, apoio e ajuda nos custos durante todo o curso. Por sempre estarem ao meu lado torcendo pelo meu sucesso e fornecendo o alicerce necessário para o meu crescimento.

Agradeço ao orientador da minha primeira iniciação científica Prof. Dr. Renato Ferretti, a minha co-orientadora Prof^a Dr^a Cintia Yuri Matsumura e à mestrandia Veridiana Carvalho por toda paciência, dedicação, ensinamentos e companhia agradável. Obrigada por terem me iniciado no universo da pesquisa e por estarem comigo desde as minhas primeiras pipetadas até a entrega do primeiro relatório final da FAPESP.

Agradeço aos meus amigos Raimundo, Felipe, Jeniffer, Christianne, Angélica, Caio, Mariana, Mayumi, Laura, Amanda, Regiane, Veridiana, que conquistei e cativei durante minha estadia em Botucatu e que vou levar para a vida. Aos momentos de descontração, risadas, festas, ajuda nos momentos difíceis, companheirismo, e compartilhamento de vidas. Obrigada por tornarem essa experiência incrível e inesquecível.

Agradeço ao meu namorado Ricardo por estar ao meu lado, perguntar e discutir sobre o projeto e me incentivar na minha caminhada.

Agradeço aos meus professores que tanto me ensinaram, sempre com paciência, dedicação e domínio dos assuntos. Obrigada por terem estimulado meu raciocínio, ampliado minhas funções cognitivas e por terem construído uma profissional feliz.

Agradeço às pós-doutorandas e doutorandas Luciana, Elisa, Monique e Carolina por terem me proporcionado tantos bons momentos em São Paulo. Obrigada pela paciência no ensinamento das técnicas, ajuda nas dificuldades, por terem compartilhado suas aflições e conquistas e por serem companhias tão agradáveis durante o meu estágio obrigatório.

Agradeço ao meu orientador Luiz Britto pela oportunidade, orientação, ajuda nas decisões, e pelo auxílio financeiro que tornou esse projeto possível e ao Adilson pela ajuda nas técnicas e experimentos.

E, por fim, agradeço a Universidade Estadual de São Paulo e a Universidade de São Paulo por terem me proporcionado experiências incríveis, amadurecimento pessoal e profissional, amigos maravilhosos e momentos inesquecíveis.

RESUMO

Ainda há muitas lacunas para serem preenchidas sobre a Doença de Alzheimer (DA), embora os estudos estejam avançando de forma significativa. Existem muitos mecanismos não esclarecidos sobre a patogênese e nenhuma forma de prevenção ou cura. Sabe-se que no desenvolvimento da doença a microglia pode sofrer alteração de fenótipo e que isso pode influenciar diretamente o neurônio. A fim de entender mais sobre as interações neuroimunes existentes na Doença de Alzheimer, esse projeto apresenta como principal objetivo investigar em que momento e de que forma ocorre a alteração do padrão de microglia M2 para M1 no modelo triplo transgênico (3xTg-AD), o modelo murino que mais se assemelha a doença em humanos. Essa alteração de padrão reflete na neurodegeneração e está relacionada às placas beta-amiloides e emaranhados neurofibrilares. Sabemos que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) acompanha a alteração do fenótipo M2 para M1, o qual é responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias que podem ser diretamente tóxicas para os neurônios. Sendo assim, queremos saber em que momento ocorre e qual mecanismo está envolvido na mudança da via de ativação da microglia do fenótipo alternativo (M2) para o clássico (M1) em camundongos 3xTg-AD, triplo transgênico para DA.

ABSTRACT

There are many questions to be solved about Alzheimer's Disease (AD), although studies are advancing significantly. There are many unenlightened mechanisms about pathogenesis and no form of prevention or cure. It is known that in the development of the disease the microglia can undergo alteration of phenotype and that this can directly influence the neuron. In order to understand more about the neuroimmune interactions existing in Alzheimer's disease, this project has as main objective to investigate when and how the M2 microglia pattern changes to M1 in the triple transgenic model (3xTg-AD), the murine model that most closely resembles the disease in humans. This pattern change reflects on neurodegeneration and is related to beta-amyloid plaques and neurofibrillary tangles. We know that increased production of reactive oxygen species (ROS) accompanies the change from M2 to M1 phenotype, which is responsible for the release of proinflammatory cytokines that may be directly toxic to neurons. Therefore, we want to know at what moment and what mechanism is involved in the change of the microglia activation pathway from the alternative phenotype (M2) to the classic (M1) in 3xTg-AD mice, the AD triple transgenic model.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	7
1.2 DIFERENÇA NA PREVALÊNCIA DA DOENÇA ENTRE HOMENS E MULHERES	9
1.3 FISIOPATOLOGIA.....	11
1.3.1 <i>Peptídeo beta-amiloide na Doença de Alzheimer</i>	11
1.3.2 <i>APOE</i>	13
1.3.3 <i>Proteína Tau Hiperfosforilada na Doença de Alzheimer</i>	14
1.4 DIAGNÓTICO	15
1.5 MICROGLIA.....	16
1.6 MODELO EXPERIMENTAL.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 ANIMAIS	26
3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA	26
3.3 CICLO ESTRAL	27
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 CICLO ESTRAL	29
4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA QUALITATIVA	30
4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA QUANTITATIVA	34
5. DISCUSSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais prevalente e é caracterizada por um declínio progressivo da função cognitiva e da memória (MINATI *et al.*, 2009). O principal fator de risco para desenvolvimento dessa doença é a idade (VARNUM E IKEZU., 2012).

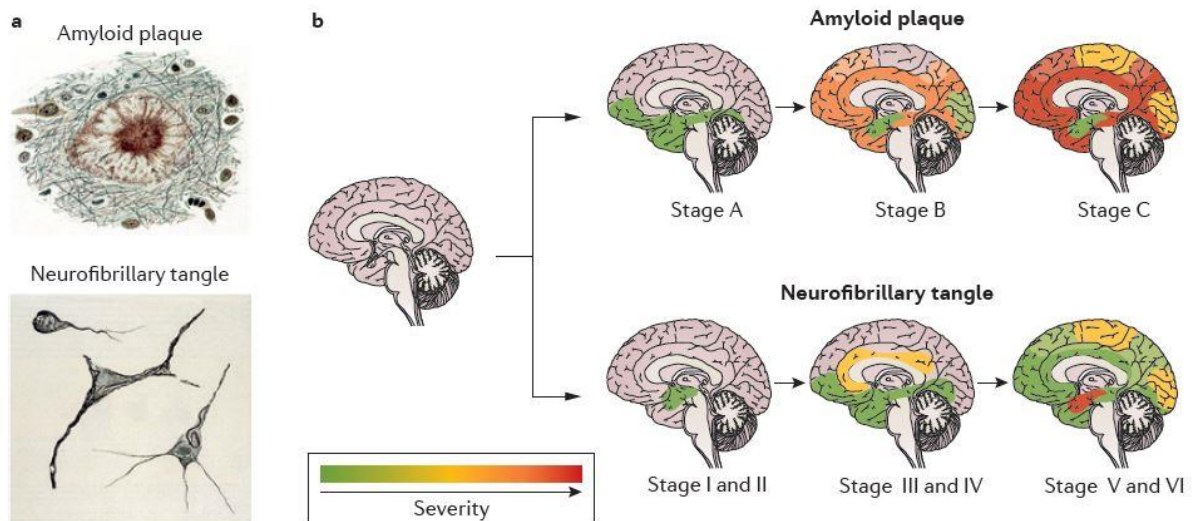
A DA é uma afecção neurodegenerativa progressiva que apresenta um longo período pré-clínico (20 anos) e uma média de duração clínica de 8 a 10 anos (MASTERS *et al.*, 2015). Ocorre perda significativa de sinapses e neurônios, principalmente nos lobos frontal e temporal e hipocampo progredindo lentamente para outras regiões cerebrais (DAVIES *et al.*, 1987; SCHEFF *et al.*, 2006; SCHEFF *et al.*, 2007).

O sintoma inicial da doença é a dificuldade gradual para lembrar informações recentes. Isso ocorre porque os primeiros neurônios a sofrerem danos e morrerem estão presentes na região do cérebro responsável pela memória recente, o hipocampo. À medida que a doença progride, indivíduos começam a apresentar dificuldades em resolver problemas, confusão em relação a tempo e espaço, perdas de memória que afetam o dia-a-dia, dificuldade em pronunciar ou escrever palavras, dificuldade em realizar tarefas domésticas, isolamento social e profissional, até mudanças no comportamento e humor, e dependência completa de membros familiares ou cuidadores de idosos (THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

A prevalência da DA na população que tem mais de 65 anos é de 10-30% e a incidência é de 1-3 % (MASTERS *et al.*, 2015). A maioria dos pacientes desenvolve o Alzheimer esporádico (>95%) que é caracterizado por um início tardio (80-90 anos de idade) e é decorrente do acúmulo de peptídeos beta-amiloides (β A) e da dificuldade em eliminá-los do interstício cerebral (MASTERS *et al.*, 2015).

Uma pequena proporção de pacientes (<1%) é portadora do Alzheimer familiar. Nesse caso, o paciente herda mutações autossômicas dominantes nos genes APP, PSEN1 e PSEN2 e desenvolve a doença precocemente (cerca de 45 anos) (MASTERS *et al.*, 2015).

As duas principais alterações neuropatológicas que caracterizam a DA são: acúmulos intraneuronais de proteína tau associada a microtúbulos hiperfosforilada conhecidos como emaranhados neurofibrilares e deposição extracelular do peptídeo β A formando placas beta-amiloides ou placas senis (DICKSON *et al.*, 1988). Essas alterações são utilizadas como biomarcadores para pesquisa e diagnóstico da DA.



Fonte: MASTERS, C.; BATEMAN, R.; BLENNOW, K.; ROWE, C.; SPERLING, R.; CUMMINGS, J.; *Alzheimer's Disease*, 2015

Figura 1. A evolução da Doença de Alzheimer. **a.** Placas beta amiloides (β A) e emaranhados neurofibrilares se disseminam pelo cérebro à medida que a doença progride. **b.** A deposição das placas β A precede a formação dos emaranhados neurofibrilares e parece iniciar nos lobos frontal e temporal, hipocampo e sistema límbico, acometendo grande parte do cérebro em estágios mais avançados da doença. Os emaranhados neurofibrilares se iniciam no lobo temporal medial e no hipocampo e progressivamente se disseminam para áreas do neocórtex.

Potenciais fatores de risco para desenvolvimento do Alzheimer foram elencados. Dentre eles estão: diabetes mellitus (risco relativo (RR): 1.46; 95% Intervalo de confiança (IC): 1.20–1.77), hipertensão durante a meia-idade (RR: 1.61; 95% IC: 1.16–2.24), obesidade durante a meia-idade (RR: 1.60; 95% IC: 1.34–1.92), sedentarismo (RR: 1.82; 95% IC: 1.19–2.78), depressão (RR: 1.65; 95% IC: 1.42–1.92), tabagismo (RR: 1.59; 95% IC: 1.15–2.20) e baixo nível educacional (RR: 1.59; 95% IC: 1.35–1.86) (NORTON *et al.*, 2014). Histórico familiar, polimorfismo do gene APOE4, doenças cardiovasculares e traumas cerebrais também exercem grande influência no desenvolvimento da DA (THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014). Mudanças nos hábitos diários como dieta, atividade física e intelectual são fatores protetores contra DA e podem reduzir esses fatores de risco, porém, não é descartada a possibilidade de desenvolver a doença (REITZ *et al.*, 2011).

A DA é compreendida por três fases: fase pré-clínica, prejuízo cognitivo brando (MCI – Mild Cognitive Impairment) e demência. A fase pré-clínica é caracterizada por ausência de sintomas. Contudo, alterações bioquímicas já estão acontecendo no cérebro e estas podem ser quantificadas através do líquido cerebrospinal, plasma ou por exames de imagem (PET). Acredita-se que as alterações cerebrais se iniciam 20 anos antes de manifestarem os primeiros sintomas (THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

O prejuízo cognitivo brando é caracterizado por mudanças sutis, porém visíveis em habilidades cognitivas, mas que não afetam a capacidade do indivíduo em desenvolver suas atividades diárias. As pessoas geralmente estranham essas alterações de memória e cognição e procuram um médico (THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

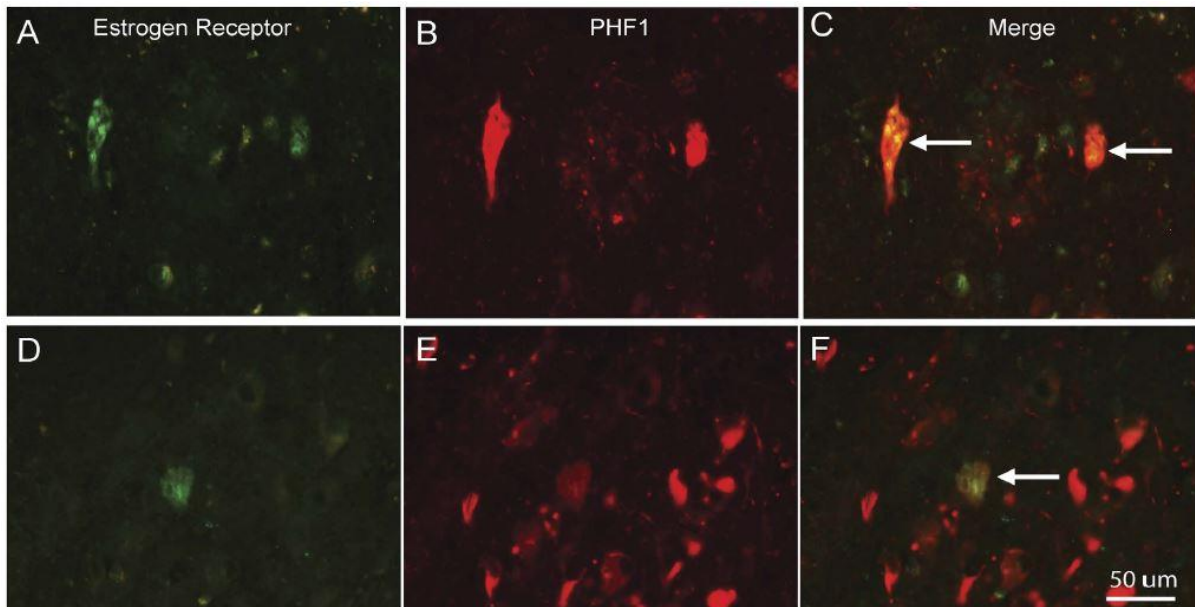
E a terceira e última fase é a demência, caracterizada por perda acentuada de memória, dificuldade para realizar tarefas e cuidar de si mesmo, mudanças comportamentais e de humor. O paciente fica acamado e apresenta completa dependência de um membro familiar ou cuidador de idoso (THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

Logo, é nítido que a DA é um problema de saúde mundial que atinge cada vez mais pessoas à medida que a expectativa de vida está aumentando devido aos avanços tecnológicos na medicina e em outras áreas do conhecimento.

1.2 DIFERENÇA NA PREVALÊNCIA DA DOENÇA ENTRE HOMENS E MULHERES

A predominância de mulheres desenvolverem Alzheimer sugere que haja um fator gênero-específico como a redução da sinalização estrógeno-receptor de estrógeno (ER- α) na DA (RUINTENBERG *et al.*, 2001). Foi observado que ER- α está localizado na mesma região que os emaranhados neurofibrilares no hipocampo e no córtex de pacientes com DA e que ER- α interage com a proteína tau *in vivo* (WANG *et al.*, 2016).

Experimentos de imunoprecipitação demonstraram que há um aumento na interação de ER- α -tau na DA, o que sugere que ER- α seja sequestrado na patologia tau. Além disso, a superexpressão de tau levou a uma interrupção na sinalização de estrógeno. Logo, sugere-se que o sequestro de ER- α pela patologia tau esteja envolvido com a perda da neuroproteção do estrógeno durante a DA (WANG *et al.*, 2016)



Fonte: WANG *et al.*, *Estrogen receptor- α is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.* 2016

Figura 2. ER- α apresenta localização sobreposta aos emaranhados neurofibrilares (NFTs) no hipocampo. (A-F) Imuno-histoquímica de dupla fluorescência mostra NFTs marcados para ER- α (verde). (A-D) A maioria dos NFTs apresentam a proteína tau fosforilada Ser396/404 sendo detectada pelo anticorpo PHF-1 (vermelho) (B,E). (C, F) mostra as imagens sobrepostas. (Setas) Demonstram a dupla marcação para PHF-1 e ER- α .

O estrógeno pertence à categoria dos neuro-esteroides e parece estar envolvido na cognição e na memória, assim como no comportamento sexual (HOJO *et al.*, 2008; WHARTON *et al.*, 2011). Há uma diminuição em processos de cognição na senescência e um dos fatores que influenciam nessa diminuição é a mudança na expressão e sinalização de ER- α (FOSTER *et al.*, 2012). A diminuição nos níveis de estrógeno devido à menopausa está muito relacionada com a ocorrência da DA (BARNES *et al.*, 2005). O estrógeno tem ação neuroprotetora já que reduz a toxicidade do glutamato e das placas β A (XU *et al.*, 2010) na DA, estimulando a plasticidade sináptica, regulando fatores neurotróficos e facilitando a transcrição de fatores de ativação, reduzindo a inflamação no cérebro (CORREIA *et al.*, 2010; POMPILI *et al.*, 2012) e diminuindo a hiperfosforilação da proteína tau (LEE *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2008).

Existem dois tipos de receptores de estrógeno: ER- α e ER- β . Ambos são distribuídos por todo o cérebro (PÉREZ *et al.*, 2003) sendo que ER- α promove efeito estimulatório e ER- β promove efeito inibitório dos estrógenos (PAECH *et al.*, 1997). Estudos em humanos

envolvendo polimorfismo do gene ER- α revelaram a importância desse receptor na manutenção da memória (CORBO *et al.*, 2006; FUGGER *et al.*, 2000).

Foi observada maior expressão de ER- α no núcleo basal de Meynert (ISHUNINA *et al.*, 2001), banda diagonal de Broca (ISHUNINA *et al.*, 2003), núcleo mamilar medial (ISHUNINA *et al.*, 2003) e núcleo infundibular do hipotálamo (HESTIANTORO *et al.*, 2004) em pacientes com DA quando comparados ao grupo controle. Essa expressão aumentada parece predispor à diminuição da atividade e o aumento no risco de desenvolver a DA. Por outro lado, diminuição total desses receptores foi verificada em neurônios piramidais do hipocampo de pacientes com DA (HU *et al.*, 2003). Esses achados sugerem que o ER- α exerce grande neuroproteção na DA (WANG *et al.*, 2016).

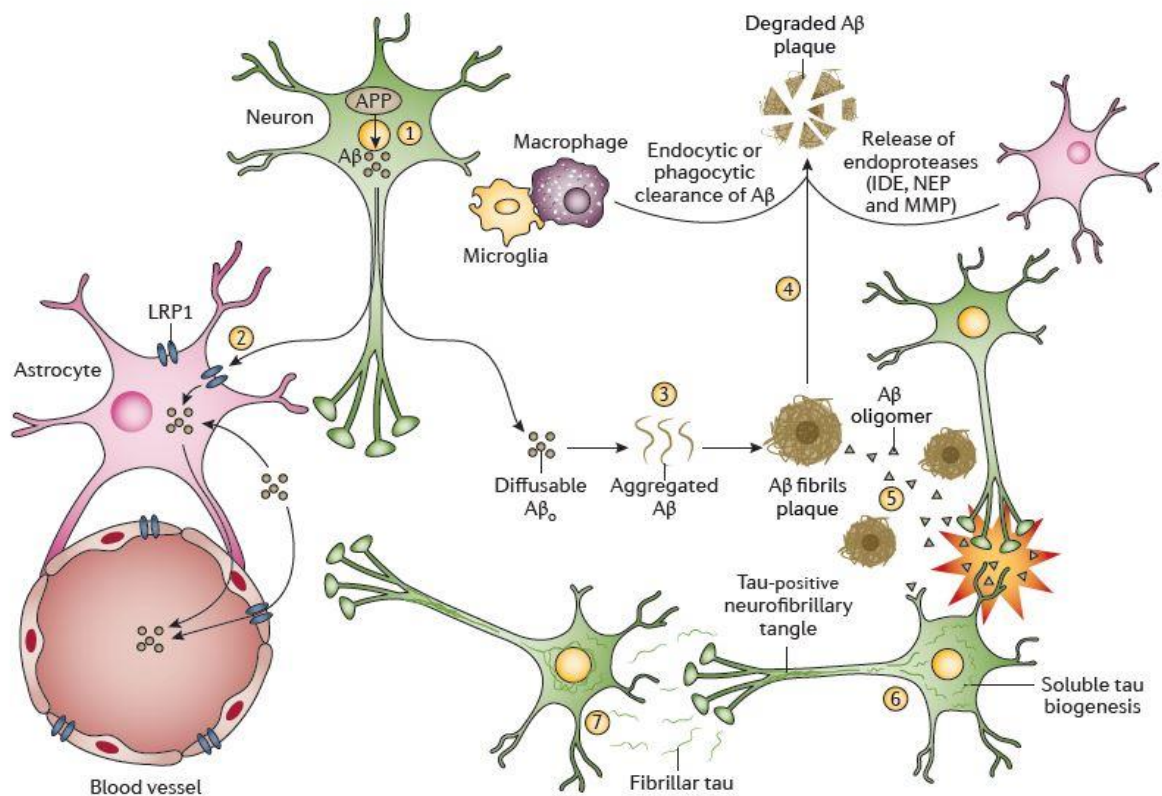
Na Austrália, 66% dos pacientes que falecem devido à DA são mulheres. Acredita-se que um dos fatores que explicam a razão dessa maior prevalência da DA em mulheres possa ser a maior expectativa de vida destas em relação aos homens (THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION., 2014).

1.3 FISIOPATOLOGIA

Os biomarcadores neuropatológicos da DA incluem diminuição de sinapses, morte de neurônios, diminuição de neurotransmissores, emaranhados neurofibrilares (intraneuronais) e placas beta-amiloides (extracelulares) (MASTERS *et al.*, 2015).

1.3.1 *Peptídeo beta-amiloide na Doença de Alzheimer*

O peptídeo β A é derivado da clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) por uma grande família de enzimas (γ -secretases e β -secretases) que incluem a presenilina 1 (PS1 codificada pelo gene PSEN1) e a presenilina 2 (PS2 codificada pelo gene PSEN2) (MASTERS *et al.*, 2015). A enzima β -secretase cliva a porção N-terminal da região β A e é seguida pela clivagem de γ -secretase originando um fragmento beta-amiloide de 40-42 aminoácidos (SEUBERT *et al.*, 1993). A maior parte dos fragmentos apresenta a isoforma β A40, sendo a isoforma β A42 menos comum e mais amiloidogênica (maior probabilidade de agregação de fragmentos) (VARNUM E IKEZU., 2012).



Fonte: MASTERS *et al.* *Alzheimer's Disease*. 2015

Figura 3. Vias que levam a formação de placas e emaranhados de acordo com a Teoria β-amiloide. Os peptídeos βA são originados a partir da clivagem de APP (1) e são liberados no meio extracelular como oligômeros difusos (βA_o). Esses oligômeros podem ser removidos por um mecanismo que envolve a APOE ou fagocitados pelos astrócitos através da ligação com o receptor relacionado a lipoproteínas de baixa densidade (LRP1) (2). βA_o podem se agregar no espaço intercelular, formando fibrilas amiloides que originarão placas amiloides (3). As placas βA podem ser removidas do interstício cerebral através de degradação endocítica ou fagocítica (macrófagos e microglia) ou por endoproteases secretadas pelos astrócitos (insulin-degrading enzyme (IDE); neprolisina (NEP); matrix metalloproteinase (MMP)) (4). Entretanto, alguns oligômeros se dissociam das fibrilas de βA e das placas βA e são tóxicos a sinapses adjacentes (5). Estes induzem agregação de tau por mecanismos ainda desconhecidos. Os danos de tau se processam no interior do neurônio e essa proteína adquire conformação fosforilada e agregativa, resultando nos emaranhados neurofibrilares (6). Fibrilas de tau podem ser liberadas e captadas por neurônios saudáveis que também passam a apresentar alterações de tau (7).

Evidências de que o peptídeo βA é uma das alterações centrais na DA podem ser sustentadas pelo Alzheimer familiar. Mutações nos genes APP, PSEN1 e PSEN2 resultam na superprodução de βA, especialmente βA42 (MASTERS *et al.*, 2015). Essas evidências levaram ao desenvolvimento da Hipótese da Cascata Amiloide (SELKOE, 1996) (Fig.3). Essa hipótese preconiza que o processamento anormal de APP, seja ele resultante de causas genéticas e/ou ambientais, leva ao aumento na produção de βA (SELKOE, 1996). O cérebro é incapaz de remover as placas de βA que gradualmente vão se acumulando. Os agregados de βA são tóxicos aos neurônios e às sinapses o que leva a ativação da microglia e de astrócitos desencadeando resposta inflamatória (MCGEER E MCGEER., 2010).

Contudo, a Hipótese da Cascata Amiloide não explica completamente a neurodegeneração verificada na DA (STRUBLE *et al.*, 2010). Primeiramente, terapias que se mostraram eficazes na remoção de fragmentos β A em animais e humanos não cessaram a progressão da doença (HOLMES *et al.*, 2008; SALLOWAY *et al.*, 2009). Além disso, peptídeos β A podem ser fisiologicamente encontrados no cérebro de humanos saudáveis e em cultura de células humanas saudáveis (SEUBERT *et al.*, 1992; SHOJI *et al.*, 1992; HAASS E DE STROOPER, 1999). Por último, indivíduos que são portadores da mutação no gene APP ou na enzima γ -secretase apresentam grandes depósitos de β A e não manifestam demência antes dos 20-40 anos (BIRD., 2008).

Os pacientes portadores de Alzheimer familiar apresentam a razão β A42/ β A40 aumentada no plasma e aumento de produção de β A42 no sistema nervoso central (SNC). Essas alterações também podem ser vistas nos pacientes portadores de Alzheimer esporádico (MASTERS *et al.*, 2015). Além disso, a cópia extra do cromossomo 21 em indivíduos com Síndrome de Down, no qual está localizado o gene APP, resulta em aumento na produção de β A. Esses indivíduos desenvolvem, aos 35 anos, alterações patológicas similares às apresentadas no Alzheimer (MASTERS *et al.*, 2015).

1.3.2 APOE

O gene que codifica APOE está localizado no cromossomo 19 e o seu polimorfismo é o fator genético mais forte para o desenvolvimento da DA. APOE está envolvida no catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Essa proteína apresenta imunorreatividade para depósitos de placas β A e para emaranhados neurofibrilares, principais marcadores patológicos do Alzheimer (MASTERS *et al.*, 2015).

APOE é uma proteína de 299 aminoácidos que possui três isoformas que diferem por 1 ou 2 aminoácidos: APOE2 (prevalência de 7%), APOE3 (prevalência de 78%) e APOE4 (prevalência de 15%) (MASTERS *et al.*, 2015). As substituições de aminoácidos afetam totalmente a estrutura e a carga da proteína, alterando sua ligação a receptores celulares e lipoproteínas. APOE é produzida primeiramente por astrócitos e microglia, mas também pode ser produzida por neurônios. Essa proteína apresenta alta expressão no cérebro (MASTERS *et al.*, 2015).

Estudos populacionais demonstram que APOE4 aumenta os riscos de desenvolver a DA (um alelo - aumento de 3x; dois alelos – aumento de 12x) e também está associada com o

desenvolvimento precoce do Alzheimer. Por outro lado, APOE2 diminui os riscos de desenvolver a DA. O alelo de APOE4 é estimado em contribuir com 50% dos casos de Alzheimer esporádico. APOE apresenta uma chaperona para β A, o que afeta a deposição e remoção do peptídeo amiloide, mas não interfere na quantidade de peptídeos β A. Portanto, as isoformas e quantidade de APOE no SNC são cruciais para determinação da deposição de placas β A e degeneração neurítica (MASTERS *et al.*, 2015).

1.3.3 *Proteína Tau Hiperfosforilada na Doença de Alzheimer*

Os emaranhados neurofibrilares de proteína tau no cérebro são as alterações patológicas mais comuns em doenças neurodegenerativas. Alterações na atividade de quinases e fosfatases levam à formação desses emaranhados (IQBAL *et al.*, 1998). Muitos estudos mostram que tau total (T-tau; todas as formas de tau, independente do estado fosforilativo) e tau fosforilada (P-tau; tau fosforilada nos resíduos de serina 181 ou 231) estão aumentadas tanto no cérebro quanto no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com Alzheimer, porém, o mecanismo de aumento e agregação de tau ainda não é conhecido (MASTERS *et al.*, 2015).

Problemas cerebrovasculares constituem um fator de risco muito importante para DA. Hipoperfusão cerebral pode levar a uma superexpressão de ciclina dependente de quinase 5 (CDK5), uma quinase serina-treonina que é crítica na formação de sinapses e plasticidade sináptica, portanto, em memória e aprendizagem. A ativação anormal de CDK5 está associada com morte e apoptose neuronal. Essa quinase pode estar envolvida na fosforilação patológica de tau, contribuindo para formação dos emaranhados neurofibrilares. A CDK5 pode ser uma proteína importante que relaciona os emaranhados neurofibrilares às placas β A (REITZ *et al.*, 2011).

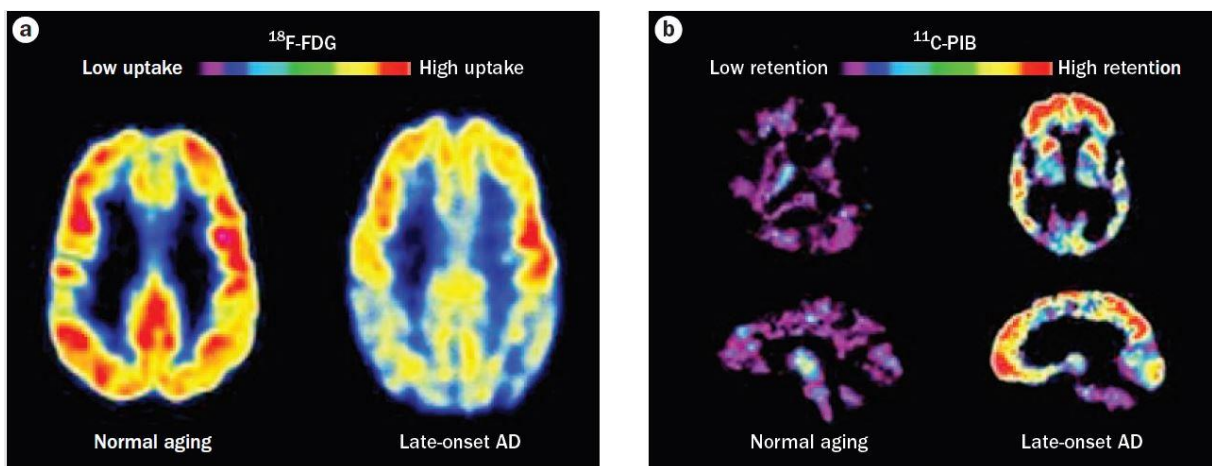
Através da análise do LCR, constatou-se que níveis de T-tau estão aumentados na AD e em outras doenças neurodegenerativas como a doença de Creutzfeldt–Jakob, sugerindo que a T-tau reflita a intensidade de degeneração de neurônios e axônios em geral. Os níveis de P-tau estão relacionados com filamentos neurofibrilares de tau post-mortem, com os ritmos de atrofia hipocampal e rápida progressão clínica (MASTERS *et al.*, 2015).

1.4 DIAGNÓTICO

A detecção do acúmulo de fragmentos β A já é possível na fase pré-clínica através dos biomarcadores β A e tau presentes no LCR e no plasma e através da técnica de PET (Positron Emission Tomography) (Fig. 4), e auxilia no diagnóstico correto da doença (MASTERS *et al.*, 2015).

O diagnóstico de Alzheimer é muito desafiador para os médicos, tanto na fase pré-clínica na qual o indivíduo apresenta lapsos de memória quanto na fase de demência. 35% dos diagnósticos clínicos de Alzheimer apresentaram resultado negativo na técnica de PET para β A. Co-morbidades como esclerose hipocampal e doenças cerebrovasculares contribuem para essa dificuldade (MASTERS *et al.*, 2015).

Anormalidades na quantificação de marcadores podem ser detectadas 15-20 anos antes dos sintomas aparecerem tanto na técnica de PET quanto na análise de LCR. Biomarcadores de função sináptica e degeneração foram recentemente desenvolvidos para análise de LCR (MASTERS *et al.*, 2015).



Fonte: REITZ *et al.*, *Epidemiology of Alzheimer's Disease*. 2011.

Figura 4. Alterações reveladas por exames de PET no cérebro com DA. **a.** Atividade metabólica em cérebro saudável e cérebro com DA esporádico de indivíduos da mesma idade. Em comparação com cérebros saudáveis, o cérebro com DA apresenta metabolismo de glicose diminuído, particularmente no lobo temporal e parietal. **b.** Hipocampo de indivíduos saudáveis e que desenvolveram DA. O aumento de concentrações de C-PIB em córtex e hipocampo de pacientes com DA sugere alta densidade de depósitos amiloides.

O surgimento da técnica de PET propiciou avanços notáveis nos estudos da DA, no diagnóstico da mesma e na correlação dos depósitos de β A e a neurodegeneração (Fig. 4).

Através de PET, há a possibilidade de fazer um monitoramento da progressão do prejuízo brando de cognição até a demência na DA. Esses estudos confirmaram que a deposição de β A começa décadas antes da demência e precede o declínio cognitivo e a atrofia cerebral. Marcadores para tau na técnica de PET ainda estão em fase de teste e, no momento em que forem padronizados, propiciarão avanços no entendimento a respeito da correlação de β A, tau e neurodegeneração (MASTERS *et al.*, 2015).

A farmacologia também está utilizando a técnica de PET a seu favor. Através de imagens adquiridas por PET, é possível visualizar e monitorar o efeito de drogas candidatas assim como identificar novos alvos terapêuticos (MASTERS *et al.*, 2015).

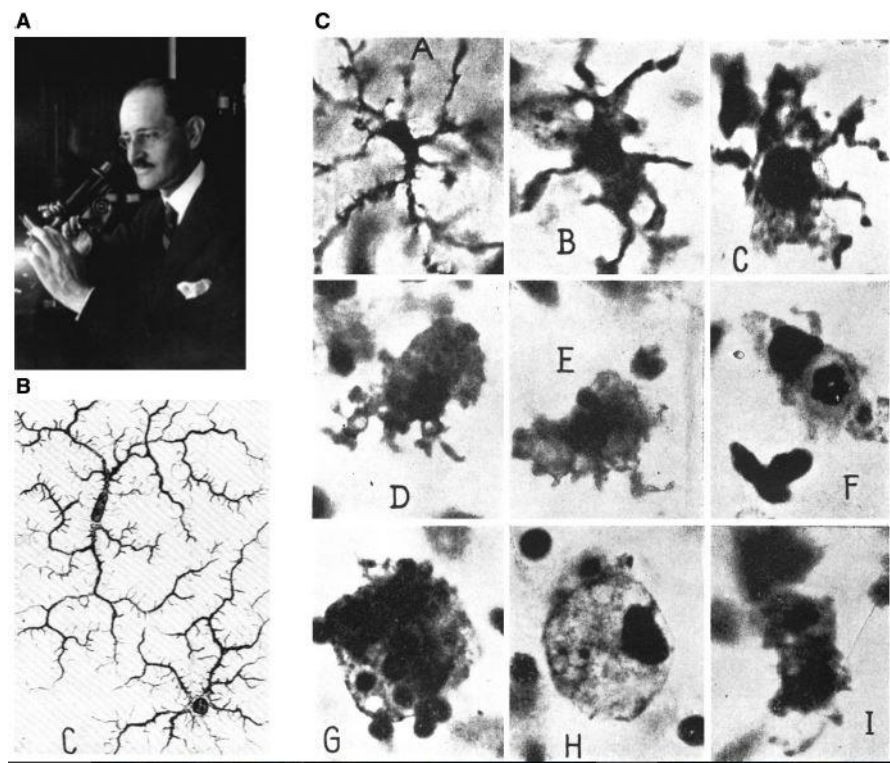
1.5 MICROGLIA

As principais células responsáveis pela resposta imune inata no sistema nervoso central são fagócitos mononucleares (microglia cerebral e macrófagos perivasculares). Essas células exercem função de sentinelas no cérebro e expressam receptores reconhecedores de patógenos (RRP) que reconhecem as vias de sinalização ativadas ou secretadas por células mortas ou danificadas (VARNUM E IKEZU., 2012).

A microglia é constituída por células ramificadas que possuem corpo celular pequeno e processos longos e finos em seu estado de quiescência (Fig. 6). Ela é amplamente distribuída pelo sistema nervoso, incluindo cérebro, medula espinal, olhos e nervo óptico (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011)

Em períodos de quiescência, desempenha função fisiológica de checagem extracelular por todo sistema nervoso, mantendo-se alerta para qualquer ameaça que possa atingi-lo. Essas células não apresentam período de inatividade e sua ativação não é dada por um evento de “tudo ou nada” (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011).

Quando a homeostase cerebral é perdida devido a algum distúrbio como doenças neurodegenerativas, isquemia e infecção, a microglia passa do estado quiescente para o ativo e sua morfologia e função são alteradas. Essas células passam a apresentar formato ameboide e processos curtos e espessos (Fig. 6). Essa conformação confere à microglia motilidade para migrar para o tecido lesionado com rapidez e eficácia (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011). No estado ativo, apresenta função fagocítica envolvida com processos de reparo frente a uma injúria ou relacionada à patologia de doenças neurológicas (ITO, D; *et al.*, 1998).



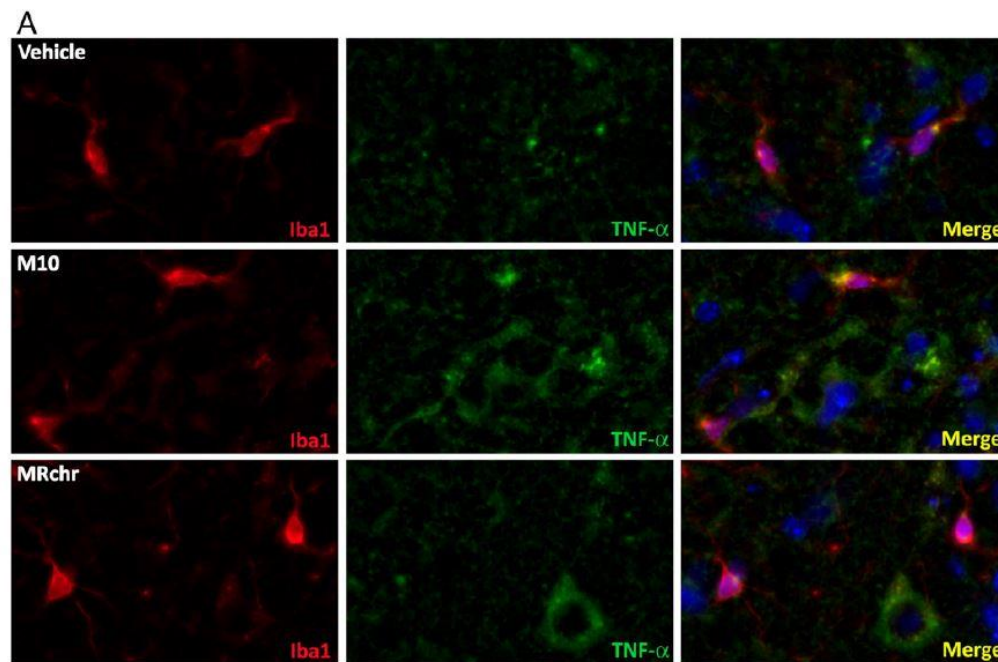
Fonte: KETTENMANN *et al.* *Physiology of Microglia*. 2011.

Figura 6. Descoberta da microglia. A. Pio del Rio-Hortega, descobridor da microglia. B. Desenhos de Hortega de uma microglia ramificada. C. Evolução da morfologia da microglia durante sua atividade fagocítica. A. Célula com prolongamentos curtos e grossos. B. Células com prolongamentos curtos e corpo celular aumentado. C. Célula hipertrofiada com pseudópodes. D e E. Forma ameboide e pseudópica. F. Célula com leucócito fagocitado. G. Célula com eritrócitos fagocitados. H. Célula granular adiposa. I. Célula em divisão mitótica.

A ativação microglial é coexistente com a doença de Alzheimer (DA), mas sua função ainda não está totalmente esclarecida (JIMENEZ, S; *et al.*, 2008). Descobertas recentes sugerem que a microglia ativada se comporta como macrófagos periféricos do sistema nervoso central, assumindo o fenótipo clássico pró-inflamatório (M1) ou o fenótipo alternativo anti-inflamatório M2 (Fig. 9) (PISANU, A. *et al.*, 2014).

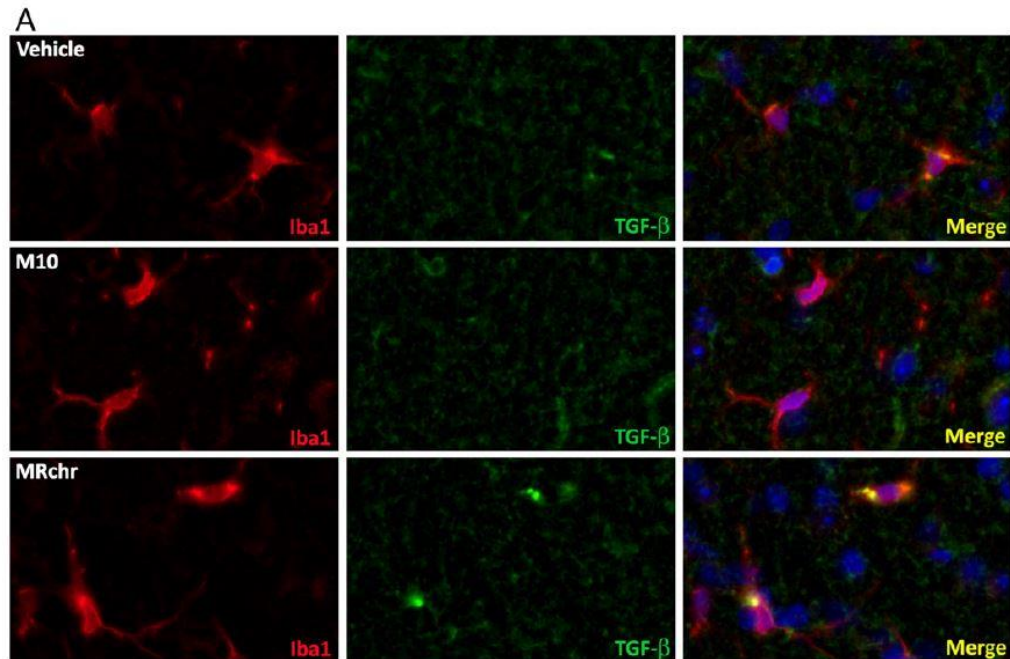
A sobreposição da ativação de M1 em relação à M2 está relacionada à progressão da DA e a modulação dos fenótipos da microglia é um alvo terapêutico promissor para neuroproteção. (PISANU, A. *et al*, 2014)

O fenótipo M1 está relacionado à produção de fatores neurotóxicos como citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, CD86) (Fig. 7, Fig. 9), espécies reativas de oxigênio (EROs), NOS (*nitric oxide synthase*) e glutamato enquanto que o fenótipo M2 secreta moléculas anti-inflamatórias, como citocinas anti-inflamatórias (TGF- α , TGF- β , IL-4, CD200, CD206, IL-10, Arg-1) (Fig. 8, Fig. 9), neurotrofinas e receptores de membrana (VARNUM E IKEZU., 2012). CD206, por exemplo, é um receptor de membrana que reconhece ligantes de carboidrato e reflete o fenótipo M2 da microglia. Está associado a neuro-restauração e processos endocíticos (PEREGO, *et al.*, 2011).



Fonte: PISANU *et al.*, *Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease.* 2014.

Figura 7. Microglia e o perfil M1 clássico. Imunorreatividade de TNF- α em microglia no SNC. Iba1 (vermelho) TNF- α (verde) e elementos sobrepostos (amarelo). Escala: 10 μ m.



Fonte: PISANU *et al.*, *Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease.* 2014.

Figura 8. Microglia e o perfil M2 alternativo. Imunorreatividade de TGF- β em microglia no SNC. Iba1 (vermelho), TGF- β (verde) e elementos sobrepostos (amarelo). Escala: 10 μ m.

Como proposto na Hipótese da Inflamação do Alzheimer, o processo neurodegenerativo pode ser exacerbado por uma resposta inflamatória crônica frente às placas β A, já que no fenótipo de ativação M1, as células imunes ativadas secretam produtos tóxicos como citocinas inflamatórias, EROs e outros fatores (JIMENEZ, S; *et al*, 2008).

Por outro lado, se a via de ativação microglial for a alternativa (M2), células gliais ativadas têm a capacidade de secretar citocinas anti-inflamatórias e fatores neuro-protetores que podem proteger contra AD (JIMENEZ, S; *et al.*, 2008).

As células da microglia apresentam heterogeneidade importante. Elas podem diferir de acordo com a região cerebral na qual estão localizadas e expressar diferentes proteínas constitutivas ou induzidas como CD4, CD86, IL-6, TNF- α , CD11c, integrinas, IGF-1. A expressão do receptor imunorregulatório Tim-3, por exemplo, é diferente na substância branca em relação à cinzenta. A heterogeneidade também foi observada em microglia presente no cérebro senescente e demonstra uma mudança natural do perfil M2 para M1 conforme a idade (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011).

A identificação da microglia por marcadores já conhecidos é muito importante para diferenciá-la de oligodendrócitos, astrócitos, neurônios e células endoteliais (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011). A proteína Iba1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*) é uma proteína ligadora de cálcio que é expressa exclusivamente na microglia. Isso foi comprovado através de experimentos *in vitro* e *in vivo* (ITO, D; *et al.*, 1998).

Iba1 é uma proteína pequena de 17 kDa que pertence à grande família de proteínas EF-hand. Essa molécula adaptadora auxilia nas vias de sinalização de cálcio no sistema nervoso central e desempenha função reguladora sobre a microglia, especialmente em seu estado ativado (ITO, D; *et al.*, 1998).

OX-42 é outro marcador clássico. A população de células positivas para Iba1 é similar à de OX-42. Iba1 e OX-42 são marcadores de microglia ramificada e sua expressão aumenta com a ativação microglial (ITO, D; *et al.*, 1998).

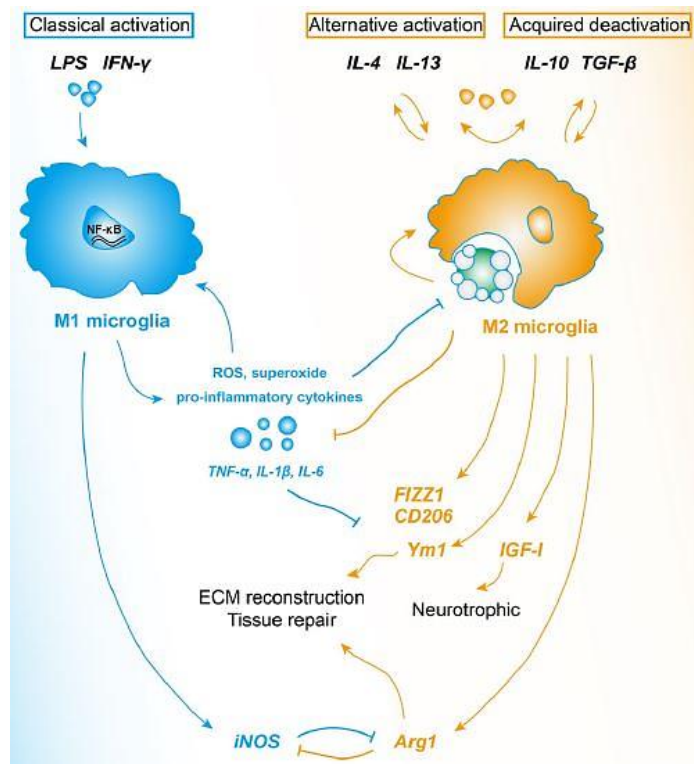
Uma nova hipótese vem sendo aceita para explicar a DA de uma forma mais abrangente. Ela sugere que o dano neuronal visto na doença não é unicamente resultado da deposição de β A ou dos emaranhados neurofibrilares de tau, mas também está relacionada às respostas inflamatória e oxidativa desreguladas que ocorrem na patologia (MCGEER *et al.*, 1989; MCGEER *et al.*, 1994).

Além disso, alguns indivíduos que apresentam carga de β A aumentada não desenvolvem a DA, sugerindo que um fator secundário como a microgliose seja necessário para o desenvolvimento da doença (VARNUM E IKEZU., 2012).

As vias de ativação microglial parecem alterar de fenótipo mesmo na ausência de distúrbios neurodegenerativos, sendo que o envelhecimento é um dos fatores determinantes para essa alteração. Nos idosos saudáveis também ocorre a mudança de fenótipo anti-inflamatório (M2) para o fenótipo pró-inflamatório (M1). O processo fagocítico da microglia em M2 parece ter um controle fino, sendo eficiente para barrar antígenos ou alterações estruturais, como placas β A e emaranhados neurofibrilares já em M1, a função fagocítica é destrutiva às células e a homeostase é perdida (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011).

Nos estágios iniciais da DA é verificado perfil M2 da microglia e há liberação de fatores neuroprotetores. A microglia apresenta-se eficiente em fagocitar as placas amiloides existentes, que ainda estão em número diminuto. À medida que a doença progride, ocorre a deposição das placas amiloides associada aos emaranhados neurofibrilares e, em certo momento, a atividade

fagocítica dessas células parece ser insuficiente para deter as alterações que estão ocorrendo e se acumulando. O perfil da microglia altera para M1 e citocinas inflamatórias e neurotóxicas são liberadas, contribuindo para piora no quadro neurodegenerativo. Ainda não se sabe qual é o mecanismo pelo qual ocorre essa alteração de fenótipo, tanto na DA quanto no envelhecimento natural, como ele é desencadeado, quais são fatores determinantes para essa mudança e nem em que momento isso ocorre (VARNUM E IKEZU., 2012)



Fonte: TANG e LE. *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases*. 2016.

Figura 9. Microglia M1 e M2. A microglia apresenta os fenótipos de ativação clássica, alternativa e desativação adquirida dependendo do meio no qual está ativa e os fatores que a estão estimulando. A microglia em seu fenótipo clássico é denominada microglia M1 e induz iNOS e NFκβ a produzirem várias citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β, IL-6, EROS e NO. A microglia M2 inclui os fenótipos alternativo e de desativação adquirida que são induzidos por IL-4/IL-13 e IL-10/TGF-β respectivamente. M2 facilita a fagocitose de células que sofreram dano, promove reconstrução de matriz extracelular (ECM) e reparo tecidual. M2 é regulada por vários fatores anti-inflamatórios e antagoniza a resposta M1 resultando em imunossupressão e proteção neuronal.

Essa alteração de fenótipo pode ser a causa da atrofia significativa no córtex e no hipocampo e, portanto, a neurogênese é um alvo primário para o estudo de vias que compensem essa perda (VOLOBOUEVA E GIFFARD, 2011).

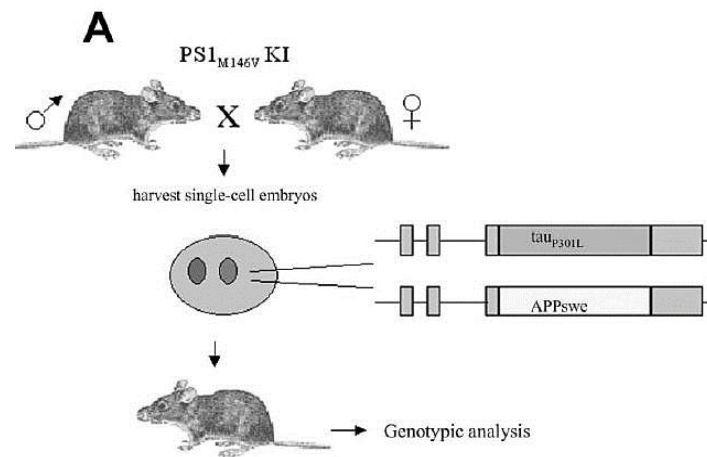
Há, portanto, grande interesse em descobrir através de qual mecanismo ocorre a mudança de ativação da microglia do fenótipo alternativo para o clássico e em que momento isso se sucede para que sejam possíveis avanços no entendimento da doença e até mesmo na fisiologia do envelhecimento.

1.6 MODELO EXPERIMENTAL

Para que seja possível estudar a neuropatologia do Alzheimer, é preferível um modelo animal que apresente placas amiloides e emaranhados neurofibrilares simultaneamente, mimetizando o quadro da doença apresentada em humanos. O modelo escolhido para a realização do projeto foi o triplo transgênico 3xTg-AD (PS1_{M146V}, APP_{Swe}, and tau_{P301L}). Ele atende a esse requisito, simulando os dois biomarcadores neuropatológicos da DA em camundongos.

Muitos modelos manifestam depósitos de placas amiloides com sucesso através da geração de camundongos com superexpressão de APP e portadores de um alelo mutante PS1 que acelera a deposição das placas simulando a DA (ODDO *et al.*, 2003). Porém, simular apenas um biomarcador neuropatológico se mostrava ineficiente para o estudo do Alzheimer. Logo, era necessário um modelo que expressasse os dois biomarcadores neuropatológicos simultaneamente (WONG *et al.*, 2002).

Para derivação e caracterização do modelo 3xTg-AD, em vez de cruzar três linhagens transgênicas, dois transgenes independentes humanos APP_{Swe} e tau_{P301L} foram microinjetados em células embrionárias únicas derivadas de animais homozigotos mutantes *knockins* PS1_{M146V}, (PS1- KI), gerando camundongos com o mesmo *background* genético (Fig. 10) (ODDO *et al.*, 2003).



ODDO *et al.* Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. 2003.

Figura 10. Estratégia utilizada para desenvolver o modelo 3xTg-AD. Através da técnica de microinjeção pró-nuclear, foram injetados simultaneamente dois transgenes independentes APP_{Swe} e tau_{P230L} em células individuais embrionárias obtidas do camundongo homocigoto knockin PS1_{M146V}.

Para saber em quais regiões seriam expressos os genes de tau e APP foi realizado imunoblotting para várias regiões cerebrais e constatou-se que os níveis de APP e tau eram mais expressos em regiões importantes para DA como hipocampo e córtex cerebral. Também foram comparados níveis de β A40 e β A42 e verificou-se que há um aumento progressivo na formação de β A, particularmente β A42 (ODDO *et al.*, 2003).

Vários experimentos foram realizados a fim de caracterizar as alterações patológicas apresentadas pelo modelo 3xTg AD em diferentes idades. Aos 3-4 meses, os animais começam a apresentar imunorreatividade β A intracelular no neocórtex. Aos 6 meses, há imunorreatividade β A intracelular no neocórtex e na região CA1 do hipocampo, além de LTP (*Long-term Potentiation* - aprendizado e memória) severamente comprometido e transmissão sináptica basal comprometida. Entre 6 e 12 meses, os animais começam a apresentar depósitos de placas β A extracelulares no córtex frontal. Aos 9 meses, surgem as primeiras alterações de tau (emaranhados neurofibrilares). Aos 12 meses, é estabelecida a imunorreatividade de tau (neurofilamentos) e depósitos extracelulares de β A, no córtex, hipocampo e amígdala. Aos 18 meses, além das alterações já citadas, foram encontrados epítomos específicos para β A42 em associação a emaranhados neurofibrilares (ODDO *et al.*, 2003).

O triplo transgênico desenvolve placas amiloides e emaranhados neurofibrilares progressivamente, e em idades mais avançadas, apresenta disfunção sináptica, incluindo LTP. Devido a essas características, é o modelo mais adequado para estudo do Alzheimer e para desenvolvimento de novas terapias farmacológicas já que mimetiza com alta similaridade a patologia desenvolvida pelos humanos (ODDO *et al.*, 2003).

A doença de Alzheimer ainda apresenta muitos mistérios a serem desvendados. Através de modelos experimentais e estudo em humanos é possível minimizar esse abismo entre o conhecido e o desconhecido. A microglia, principal foco desse estudo, é um fator potencial para entender a fisiopatologia do Alzheimer.

É visível que a DA é um problema de saúde pública já que acomete cada vez mais pessoas à medida que a população está envelhecendo. Através do modelo triplo transgênico, focamos nossos esforços em determinar o momento no qual ocorre a mudança do fenótipo alternativo (M2) para o clássico (M1), e como isso ocorre. A dualidade apresentada pela microglia expande os horizontes do conhecimento e origina muitas linhas de pesquisa com o intuito de esclarecer esse mecanismo. Através dessa contribuição, estaremos mais próximos do entendimento da fisiopatologia da DA, relacionando a microglia às alterações neuropatológicas encontradas na doença, visando terapias curativas que devolvam o bem-estar e a felicidade aos pacientes e seus membros familiares.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as alterações neuroimunes que ocorrem na doença de Alzheimer

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar em que momento ocorre a alteração da via de ativação da microglia do fenótipo alternativo (M2) para o fenótipo clássico (M1).
- Analisar as alterações morfológicas e quantitativas da microglia à medida que a doença de Alzheimer progride.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas (1, 6, 9, 12 e 18 meses de idade /10-45g) fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os camundongos fêmeas foram distribuídos em dois grupos:

- Controle (WT): linhagem C57Bl/6 129 PS1 (n = 14)
- Modelo de Alzheimer: linhagem 3xTg AD (PS1_{M146V}, APP_{Swe}, and tau_{P301L}) (n=9)

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Animais dos 2 grupos foram anestesiados (50µl de Anasedan (Xilazina) + 50µl de Dopalen (Ketamina)) e foram submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina 0,9%, seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído (PFA) 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e armazenados em PFA 4% durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB. Após 24 horas, os tecidos foram cortados em espessura de 30µm em micrótomo deslizante de congelamento.

Os cortes histológicos foram colocados em placa de cultivo em solução anti-freeze e mantidos em geladeira a 4°C até o momento do procedimento da técnica. Seções de hipocampo foram selecionadas e submetidas à metodologia de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-Iba1, anti-OX-42 e anti-iNOS.

A realização da imuno-histoquímica se procedeu da seguinte forma: os cortes selecionados foram lavados em tampão fosfato (PB 0,1M) por três vezes de 10 minutos e incubados com anticorpos primários específicos para IBA1, OX42 e iNOS, em diferentes concentrações (1:1000, 1:1000 e 1:500, respectivamente), em PB com 0,3% de Triton X-100, adicionado de NDS (*Normal Donkey Serum*) 5%, *overnight* à temperatura ambiente.

Os cortes foram novamente lavados em tampão fosfato à temperatura ambiente e incubados por duas horas com anticorpo secundário biotilado contra as imunoglobulinas do animal no qual foi feito o anticorpo primário (IBA1 – *Goat Anti-Donkey* Biotilado; OX-42 – *Mouse Anti-Donkey* Biotilado; iNOS – *Mouse Anti-Donkey* Biotilado) na concentração de 1:200. Após nova série de lavagens à temperatura ambiente, os cortes foram colocados por duas horas numa solução de Triton-X-100 0,3 % em tampão fosfato 0,1M com 0,4M de NaCl, contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC ELITE kit, Vector Labs.).

Após nova série de lavagens, os cortes foram imersos em um meio contendo 3-3'diaminobenzidina (DAB- Sigma-Aldrich) 0,05% em tampão fosfato 0,1M por cerca de 5 minutos. Foram acrescentados a seguir 3 ml de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% em água destilada e os cortes permaneceram incubados até que a reação fosse evidenciada. Atingida a imunorreatividade desejada com o desenvolvimento de coloração marrom clara, os cortes foram removidos da solução com DAB e imersos em tampão PB 0,1M.

Depois de nova série de lavagens em tampão fosfato 0,1M com o objetivo de remoção do excesso de reagente, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas e colocadas em placa quente. Depois de secas, as lâminas foram hidratadas em água destilada por 5 minutos, banhadas em solução de tetróxido de ósmio 0,1% por 30 segundos, desidratadas por uma série de álcoois em concentrações crescentes e cobertas com lamínulas, tendo como meio de montagem o *Permount* (Sigma). A imunorreatividade foi analisada ao microscópio de luz e quantificações foram realizadas com o programa ImageJ.

3.3 CICLO ESTRAL

No período de quinze dias que antecedeu à eutanásia das fêmeas, foi realizada a coleta de secreção vaginal todas as manhãs, entre as 00:08 e 10:00 horas. A secreção foi coletada por meio de uma ponteira de plástico com salina (NaCl 0,9%) através da introdução superficial desta na vagina do camundongo fêmea. Utilizou-se uma ponteira para cada fêmea. O líquido vaginal foi colocado em lâmina e o esfregaço vaginal foi visto em microscópio de luz a fresco e sem coloração. Três tipos de células puderam ser vistos: leucócitos, células epiteliais conificadas e células nucleadas.

O ciclo estral tem duração de quatro a cinco dias e é composto por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro apresenta duração de 12 horas, é caracterizado por células epiteliais conificadas, leucócitos polimorfonucleares (PMN), células nucleadas e muco pegajoso e corresponde à fase de maturação dos folículos. O estro apresenta duração de 12

horas, é caracterizado por células epiteliais conificadas (sem núcleo) e corresponde à fase de ovulação do camundongo fêmea. O metaestro apresenta duração de 21 horas, é caracterizado pela diminuição de células conificadas, aumento de leucócitos PMN e corresponde à formação do corpo lúteo. Por fim, o diestro apresenta duração de 57 horas, é caracterizado por leucócitos PMN, não há muco e corresponde à fase de regressão do corpo lúteo. As quatro fases podem ser vistas em microscópio de luz a partir do esfregaço vaginal.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística com o uso do *software* GraphPadPrism 7.02. As comparações entre os grupos foram conduzidas a partir do teste ANOVA para medidas não-repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni quando a análise de variância apresentou diferença estatisticamente significativa. Para todos os testes, o nível de significância assumido foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 CICLO ESTRAL

Foi coletado esfregaço vaginal de todos os camundongos fêmeas (Controle – WT e triplo transgênico – AD) no período da manhã (entre 08:00 e 10:00), excetuando-se os animais de 1 mês de vida pós-natal nos quais não foi observada maturação sexual dos órgãos genitais. A partir da visualização do material biológico fresco e sem coloração em microscópio de luz, foram observadas células que caracterizavam as diferentes fases do ciclo: proestro, estro, metaestro e diestro (Tabela 1). Não foi observada interferência significativa das fases do ciclo estral na progressão da DA.

Linagem	Idade (mês)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
WT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WT	6	D	D	D	P	Eu										
WT	6	M	D	D	P	Eu										
WT	6	P	P	E/M	M/D	M/D	D	D	D	Eu						
WT	9	D	D	D	P	E/M	M	D	D	P/E	E	M	D	P	E	E
WT	9	P/E	E	E/M	D	D	P/E	P/E	E	E	M	D	P	E	M	D
WT	9	E	E/M	M	D	D	D	D	P	E	M	D	D	P	P	E
WT	12	D	D	D	P	E	E	M	M	D	D	D	D	D	D	Eu
WT	12	M	D	P	E	E	E	E	E	E	E	M/D	D	D	D	Eu
WT	12	M	D	P	E	E	E	E	E	E	E	M	M	D	D	Eu
WT	18	D	D	D	Eu											
WT	18	E	E/D	E/D	D	D	D	D/E	E	E/D	D	D	D	D	D	D
AD	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AD	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AD	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AD	6	P	P	E	E	E	M	D	P/E	Eu						
AD	6	E	D	D	D	D	P	E	M	Eu						
AD	9	D	D	D	P/E	E	M	M/D	P/E	P/E	D	D	D	D	D	M
AD	12	E	Eu													
AD	18	D	D	D	D	P	E	E	M	D/P	E/M	D	D	D	D	D
AD	18	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Tabela 1. Ciclo estral de camundongos fêmea WT e AD. Foi coletado esfregaço vaginal para determinar o ciclo estral durante quinze dias precedentes à eutanásia dos animais a fim de avaliar as fases do ciclo estral e se estas poderiam exercer alguma interferência na DA e na marcação de microglia. Não foi verificada nenhuma interferência significativa. **P** – Proestro; **E** – Estro; **M** – Metaestro; **D** – Diestro; **Eu** – Eutanásia. Não foi possível realizar o esfregaço dos animais de 1 mês devido ao não amadurecimento sexual dos órgãos genitais.

4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA QUALITATIVA

A fim de observar as diferenças na atividade e morfologia da microglia foi realizada imuno-histoquímica para os marcadores Iba1, OX-42 e iNOS em seções de hipocampo de animais controle (WT) e triplo-transgênico (AD) de idades crescentes: 1 mês (n=6), 6 meses (n=5), 9 meses (n=4), 12 meses (n=4) e 18 meses (n=4). A sub-região CA1 do hipocampo foi escolhida para ilustrar os marcadores (Fig. 11; Fig. 12; Fig. 13), já que essa região é mais acometida na DA. Através da marcação de Iba1 pudemos observar a diferença na morfologia da microglia, já que esse marcador é específico para essas células e possibilita visualizar seus prolongamentos e corpo celular. Em seções de hipocampo de animais de 9 e 18 meses, há quantidade aumentada dos níveis de microglia e predominância da forma ameboide, que caracteriza o estado ativo desta. Já nos animais de 1 mês e 6 meses, além da quantidade reduzida, a microglia apresenta-se com prolongamentos mais longos e finos e corpo celular menor.

Em relação aos marcadores OX-42 e iNOS, não é perceptível diferença qualitativa entre as seções de hipocampo devido ao perfil mais subjetivo de marcação, que evidencia os prolongamentos da microglia. Pode-se verificar diferenças entre os animais WT e AD quando marcados com OX-42, sendo que os animais WT apresentam menor imunorreatividade para esse marcador quando comparados aos animais AD. Nos animais AD de 1, 9 e 18 meses verifica-se aumento dos níveis de expressão para o marcador OX-42.

A imunorreatividade para iNOS se manteve constante com exceção aos 18 meses, tanto em animais AD quanto WT, idade esta que apresenta qualitativamente maior expressão de iNOS, o que condiz com a teoria de que o perfil M1 está mais ativo em animais senescentes.

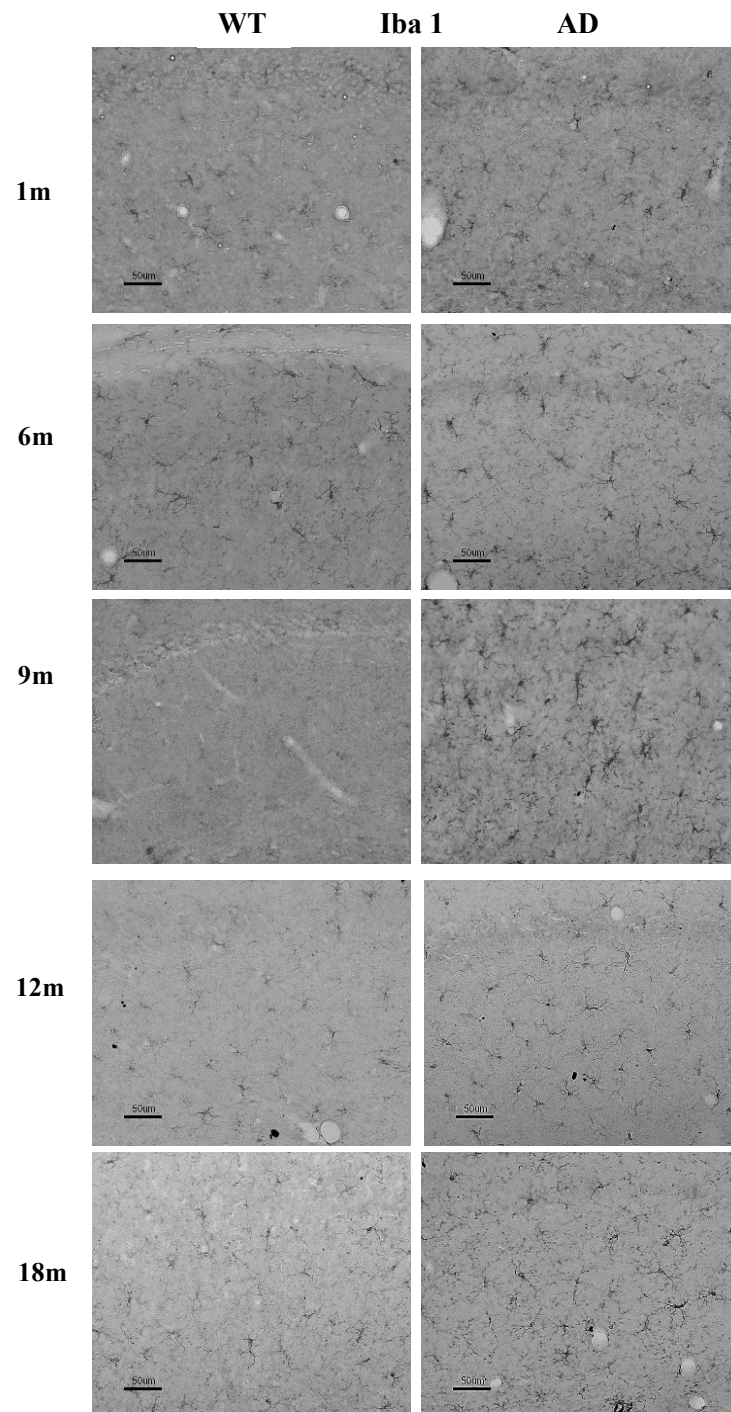


Figura 11. Micrografias da região CA1 do hipocampo de camundongos fêmeas do grupo controle (WT) e do grupo transgênico (AD) de 1, 6, 9, 12 e 18 meses de idade. Imunoreatividade para Iba1 visualizada em microscópio de luz.

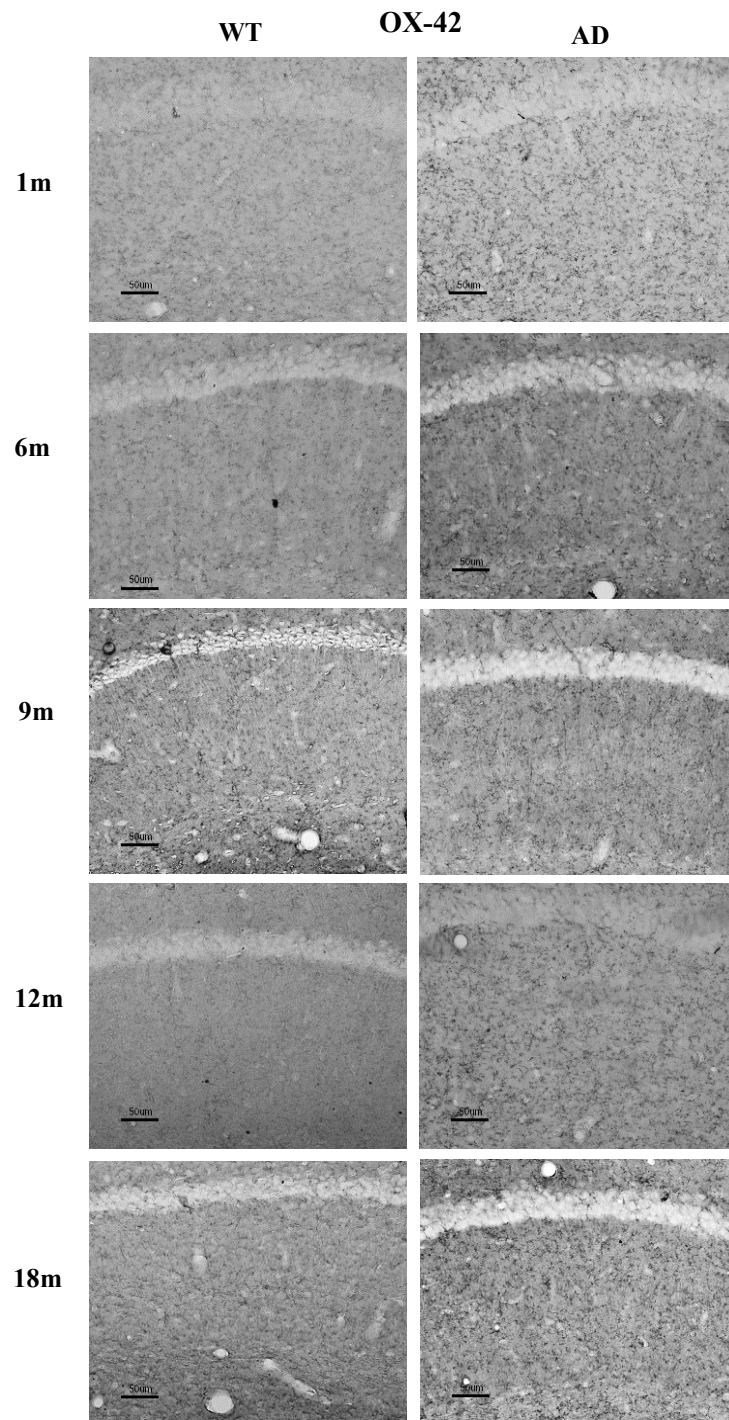


Figura 12. Micrografias da região CA1 do hipocampo de camundongos fêmeas do grupo controle (WT) e do grupo transgênico (AD) de 1, 6, 9, 12 e 18 meses de idade. Imunoreatividade para OX-42 visualizada em microscópio de luz.

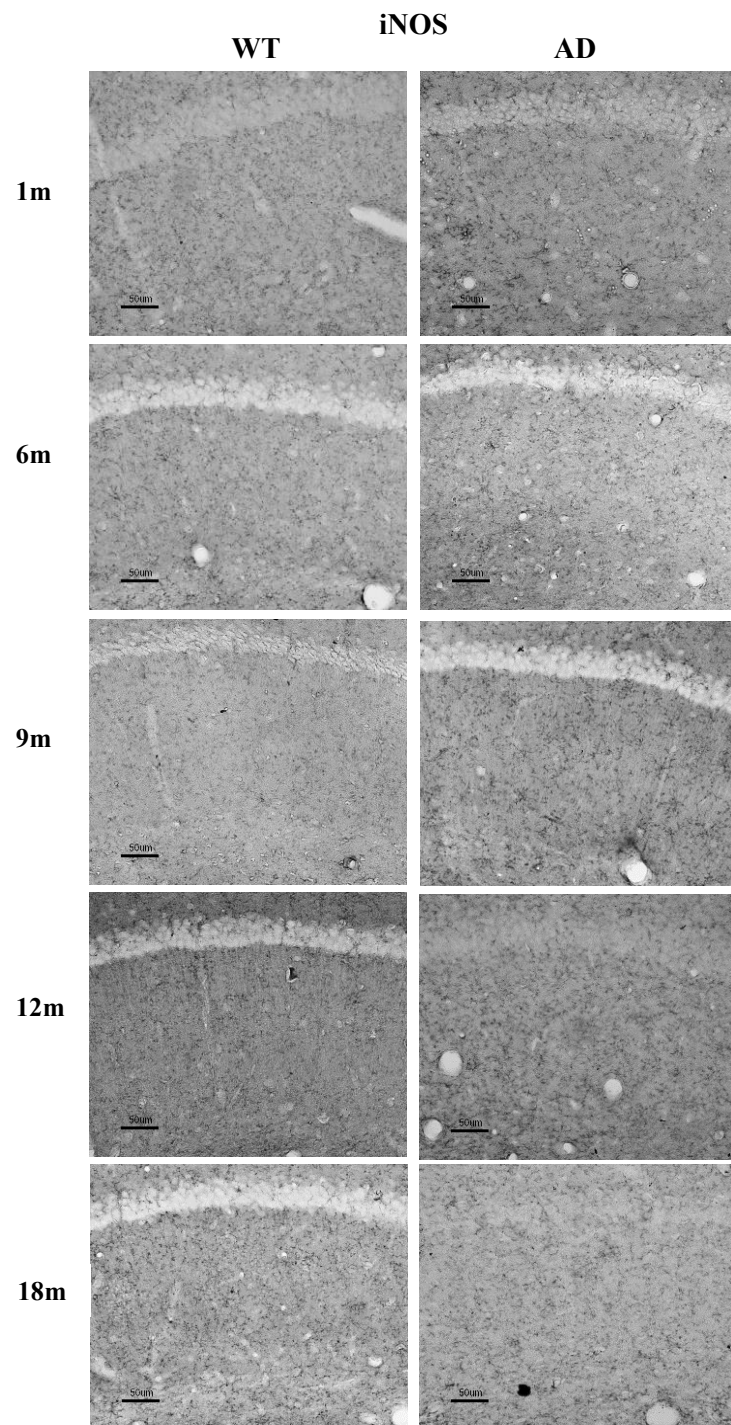


Figura 13. Micrografias da região CA1 do hipocampo de camundongos fêmeas do grupo controle (WT) e do grupo transgênico (AD) de 1, 6, 9, 12 e 18 meses de idade. Imunorreatividade para iNOS visualizada em microscópio de luz.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA QUANTITATIVA

Foi realizada quantificação da densidade integrada (DI) das micrografias de seções de hipocampo obtidas a partir da técnica de imuno-histoquímica para os marcadores Iba1, OX-42 e iNOS. Os gráficos representam uma comparação entre animais controle (WT) e transgênicos (AD) de idades crescentes (1, 6, 9, 12, 18 meses) (Fig.14). Observa-se perfil de expressão diferenciado na idade 9 meses para os marcadores Iba1 e OX-42 e nos animais de 18 meses para o marcador Iba1.

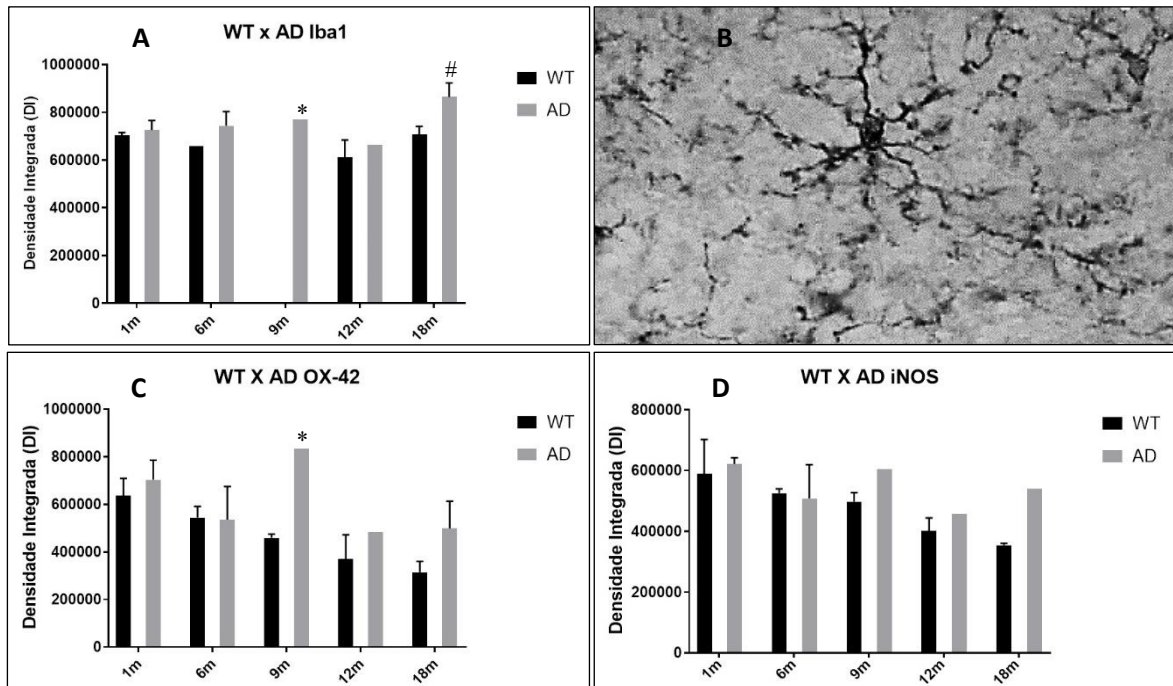


Figura 14. Diferenças na expressão de marcadores de microglia em animais WT e 3xTg-AD. **A.** Análise de densidade integrada para o marcador de microglia ramificada ativada Iba1. Notam-se diferenças significativas (*, # $p < 0,01$) em animais AD de idades 9 e 18 meses quando comparados ao WT e demais idades e ausência de expressão de Iba1 em animais WT de 9 meses. **B.** Imunorreatividade para o marcador Iba1 retratando a morfologia da microglia ramificada: corpo celular pequeno, prolongamentos longos e finos. **C.** Análise de densidade integrada para o marcador de microglia ramificada ativada OX-42. Nota-se diferença significativa (* $p < 0,01$) em animais AD de nove meses quando comparados aos animais WT e demais idades. **D.** Análise de densidade integrada para o marcador de microglia M1 iNOS. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e entre idades.

5. DISCUSSÃO

No estudo com o modelo triplo transgênico (3xTg-AD), optamos pela escolha de camundongos fêmeas já que há maior incidência da DA nesse gênero, em humanos. Já se sabe que o estrógeno está ligado ao desempenho cognitivo e à memória (HOJO *et al.*, 2008; WHARTON *et al.*, 2011) e que o receptor de estrógeno α está localizado em regiões sobrepostas aos emaranhados neurofibrilares na DA (WANG *et al.*, 2016). Além disso, a diminuição dos níveis de estrógeno em mulheres que estão no período pós-menopausa está notavelmente relacionada à DA (BARNES *et al.*, 2005).

A fim de avaliar qualitativamente essa influência, foram realizados esfregaços vaginais diários em camundongos fêmeas controle e 3xTg-AD durante quinze dias precedentes à eutanásia. O ciclo estral tem duração de 4 a 5 dias e é determinado por picos hormonais de estrógeno e progesterona que caracterizam suas diferentes fases: proestro, estro, metaestro e diestro (CORA *et al.*, 2015). As fêmeas foram alojadas em caixas na ausência de machos durante todo o período de experimentação. Não foi possível realizar o esfregaço vaginal em animais de um mês de idade, já que estes ainda não haviam atingido a maturidade sexual dos órgãos genitais. Essa maturidade ocorre entre 30 a 40 dias de vida pós-natal (RODRIGUEZ *et al.*, 1997).

Fêmeas submetidas a alojamento em superpopulação, na ausência de macho, não apresentam ciclo estral regular. Esse fenômeno é denominado Efeito de Whitten (ANDRADE *et al.*, 2002). A partir de 9 meses de idade, as fêmeas exibem alterações fisiológicas no ciclo, podendo realizar transições anormais entre as fases, como por exemplo a alternância de diestro para estro. Esse fato torna-se evidente em fêmeas idosas, nas quais há perda da ciclicidade hormonal, logo, estas podem permanecer em diestro por longos períodos e/ou apresentar fases irregulares com transições inadequadas do ciclo. Sugere-se as anormalidades encontradas no ciclo estral resultantes tanto do alojamento quanto da senescência possam explicar a não-interferência do ciclo estral na DA.

Através da análise de micrografias obtidas pela técnica de imuno-histoquímica (Fig. 11, 12, 13) podemos verificar a alteração na morfologia dessas células: em períodos quiescentes as células microgliais apresentam prolongamentos longos e finos e corpo celular pequeno (Fig. 14, B); por outro lado, quando ativas, apresentam morfologia ameboide que lhes confere motilidade e eficácia na resposta a ser desencadeada para conter algum antígeno (Fig 6, 11).

Sugere-se que a ativação da microglia no SNC seja heterogênea, caracterizada através de dois fenótipos opostos: M1 e M2. Dependendo do fenótipo ativo, a microglia pode produzir tanto fatores neurotóxicos quanto neuroprotetores, respectivamente. Essa alteração dinâmica de fenótipos está criticamente envolvida em doenças neurodegenerativas (TANG E WEIDONG, 2016).

Geralmente, o fenótipo M1 predomina nos estágios finais da doença, nos quais os processos de reparo realizados pela microglia M2 estão diminuídos. Essa sobreposição de M1 resulta em citotoxicidade para os neurônios e leva a perdas neuronais irreversíveis (TANG E WEIDONG, 2016).

Para avaliar a heterogeneidade e morfologia da microglia, foram utilizados marcadores Iba1 (canal de cálcio específico de microglia que apresenta imunorreatividade para microglia ramificada ativada), OX-42 (marcador clássico que apresenta imunorreatividade para microglia ramificada ativada) e iNOS (marcador do fenótipo clássico M1). A microglia M1 ativada induz a produção de iNOS que estimulará vias que produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, EROs e NO (TANG E WEIDONG, 2016).

A caracterização do perfil de ativação da microglia em animais triplo transgênico de diferentes idades ainda não foi realizada. Existem poucos estudos que descrevem alguma alteração e ainda não se sabe o momento em que ocorre a transição do fenótipo M2/M1 nesse modelo. Em nosso estudo, foram observadas alterações significativas ($p < 0,01$) nos animais de 9 meses (9m) para os marcadores Iba1 e OX-42, indicadores de microglia ramificada.

O marcador Iba1 está ausente em seções de hipocampo dos animais WT 9m (Fig. 14) porém, está presente em seções de córtex correspondentes à localização dessa estrutura (córtex motor). Esse evento pode ser explicado através da heterogeneidade da microglia que é idade e espaço dependente (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011). Iba1 pode estar sendo mais expresso em outras regiões cerebrais como córtex nos animais WT de 9m. Os níveis de expressão de Iba1 em animais AD de 9 e 18 meses de idade apresentam-se aumentados em relação ao controle (WT 9m e WT 18m) e às demais idades (Fig. 14), sugerindo que haja algum tipo de alteração na idade 9 meses que é sustentada aos 18 meses, no qual há o maior nível de expressão da molécula Iba1 (Fig. 14).

Outra evidência de que ocorre algum tipo de alteração na idade 9m é o aumento significativo ($p < 0,01$) da expressão de OX-42 em relação ao controle e às demais idades, seguido pela segunda maior expressão aos 18m. Embora não significativo, os níveis do marcador iNOS também estão aumentados nessa idade. É importante ressaltar que aos 9 meses,

o camundongo 3xTg-AD apresenta depósitos intra e extracelulares do peptídeo beta-amiloide e as alterações de tau intraneuronais começam a se manifestar (ODDO *et al.*, 2003), logo, as duas principais alterações neuropatológicas da doença já estão presentes nessa idade. Aos 9 meses também ocorrem alterações nos níveis hormonais dos camundongos fêmeas que podem ser vistas através da irregularidade do ciclo estral que se inicia nessa fase. Portanto, sugere-se que aos 9 meses ocorra uma mudança de natureza ainda desconhecida no perfil de ativação da microglia no modelo 3xTg-AD, evidenciada pela alteração nos níveis de expressão dos três marcadores resultando na modificação do quadro imunofisiopatológico da DA.

A caracterização do padrão de ativação da microglia e a exploração dos detalhes da alteração do fenótipo M2/M1 está sendo alvo de muitos estudos em modelos da DA, a fim de compreender essas mudanças fisiológicas que estão altamente relacionadas às mudanças neuropatológicas que caracterizam a doença.

No modelo experimental (PS1_{M146L}/APP_{751SL}) duplo transgênico para DA, constatou-se que, em estados iniciais (até 6 meses), as placas β A determinaram a ativação da micróglia alternativa que conferiu, aparentemente, neuroproteção. Em idades mais avançadas (18 meses), a acumulação extracelular de oligômeros de β A amplamente distribuídos levou à ativação da micróglia clássica e a produção de agentes citotóxicos como TNF- α (JIMENEZ, S; *et al.*, 2008). Esses resultados reforçam a ideia de que a microglia apresenta expressão idade-dependente, diferindo em estágios iniciais e tardios da doença, sugerindo que ocorra efetivamente a mudança de fenótipo dessas células.

A distribuição da microglia também pareceu ser um fator importante para o fenótipo. No modelo (PS1_{M146L}/APP_{751SL}), as células da micróglia que apresentaram imunorreatividade para TNF- α (secretado pela microglia de fenótipo M1) curiosamente não estavam associadas às placas β A, mas sim, estavam localizadas entre as placas. Sugere-se, portanto, que exista pelo menos duas populações diferentes de micróglia ativada em animais senescentes (JIMENEZ, S; *et al.*, 2008). Essa afirmação evidencia a heterogeneidade apresentada pela microglia.

O estudo com animais senescentes e transgênicos apresenta adversidades na fase experimental. Devido à diminuição da reprodução que ocorre em animais transgênicos acrescentada da dificuldade de aquisição do modelo e a susceptibilidade de animais idosos à morte, o número total de animais (n) torna-se reduzido, aumentando os vieses da experimentação. Portanto, apesar da sugestiva alteração significativa observada aos 9 meses, é necessário aumentar a quantidade de animais por grupo para determinação do momento no qual ocorre a mudança do fenótipo da microglia e como isso ocorre. O aumento do painel de

marcadores com a inserção de um marcador M2 como CD206, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β e citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-4 pode ser promissor para o entendimento da modulação neuroimune realizada pela microglia na DA em nosso estudo.

Conclui-se que o Alzheimer é uma doença multifatorial que apresenta várias vias ainda não elucidadas em sua fisiopatologia, como é o caso da modulação microglial e que essa via é de extrema importância já que está diretamente relacionada com as alterações neuropatológicas observadas na DA. Já existe caracterização do perfil microglial em outros modelos experimentais, porém nenhuma resposta conclusiva foi atingida e ainda restam muitos desafios a serem enfrentados para elucidar esse mecanismo que ocorre na DA e em tantas outras doenças inflamatórias crônicas como obesidade e resistência à insulina (TANG E WEIDONG, 2016). A partir da elucidação do mecanismo e do momento em que ocorre a mudança de fenótipo microglial novos alvos terapêuticos poderão ser propostos. A ativação reversa de M1 para M2 através de alterações genéticas, levando à liberação de citocinas anti-inflamatórias que podem minimizar os efeitos da doença é um alvo potencial. Para isso é necessário ter ciência da janela de tempo efetiva já que o tempo, os estágios e a severidade da doença estão criticamente associados às mudanças microgliais e é necessário manter um equilíbrio fino entre as respostas M1 e M2 para que eventos indesejados não se manifestem (TANG E WEIDONG, 2016). Logo, ainda há um longo processo de pesquisa e desenvolvimento que envolve a DA e esse processo tem por finalidade atingir uma terapia curativa para essa doença que atinge milhões de pessoas no mundo, reduzindo os anos finais de vida e tornando-os pesados e difíceis para o paciente e para família.

6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. **Scielo Books**, Rio de Janeiro, p. 388, 200./nov. 2016. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acesso em: 18 nov. 2016.
- ASSOCIATION, Alzheimer's. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, Naperville, v. 10, p. 47-92, mar. 2014.
- BARNES, L. L. et al. Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. **Archives of General Psychiatry**, Chicago, v. 62, p. 685-691, jun. 2005.
- BIRD., T. D.. Genetic aspects of Alzheimer disease. **Genetics in medicine:Official Journal of the American College of Medical Genetics**, Washington, v. 10, p. 231-239, abr. 2008.
- CORBO, R. et al. Association of estrogen receptor α (ESR1) PvuII and XbaI polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease and their effect on apolipoprotein E concentrations. **Dementia and geriatric cognitive disorders**, Roma, v. 22, p. 67-72, mai. 2012.
- CORREIA, S. C. et al. Effects of estrogen in the brain: is it a neuroprotective agent in Alzheimer's disease?. **Current Aging Science**, Coimbra, v. 3, p. 113-126, jul. 2010.
- DAVIES, C. et al. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. **Journal of neurological sciences**, [S.L], v. 78, p. 151-164, abr. 1987.
- DICKSON, D. et al. Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. **The American Journal of Pathology**, Nova York, v. 132, p. 86-101, jul. 1988.
- FOSTER, Thomas C.. Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. **Hippocampus**, Gainesville, v. 22, p. 656-669, abr. 2012.
- FUGGER, H. N. et al. Novel effects of estradiol and estrogen receptor α and β on cognitive function. **Brain research**, Charlottesville, v. 883, p. 258-264, nov. 2000.
- HAASS, C; STROOPER, B De. The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key.. **Science**, Munique, v. 29, p. 916-919, out. 1999.
- HESTIANTORO, A.; SWAAB, D. F.. Changes in Estrogen Receptor- α and- β in the Infundibular Nucleus of the Human Hypothalamus Are Related to the Occurrence of Alzheimer's Disease Neuropathology. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Amsterdam, v. 89, p. 1912-1925, abr. 2004.
- HOJO, Y. et al. Estrogen synthesis in the brain—role in synaptic plasticity and memory. **Molecular and cellular endocrinology**, Tokyo, v. 290, p. 31-43, ago. 2008.

- HOLMES, C. et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial.. **Lancet**, Southampton, v. 19, p. 216-223, jul. 2008.
- IQBAL, K. et al. Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles.. **Journal of Neural transmission**, Staten Island, v. 53, p. 169-180, jan. 1998.
- ISHUNINA, T. A; KAMPHORST, W; SWAAB, D. F.. Changes in metabolic activity and estrogen receptors in the human medial mamillary nucleus: relation to sex, aging and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, Amsterdam, v. 24, p. 817–828, out. 2003.
- ISHUNINA, T. A; SWAAB, D. F.. Increased expression of estrogen receptor α and β in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, Amsterdam, v. 22, p. 417–426, mai./jun. 2001.
- ISHUNINA, T. A; SWAAB, D. F.. Increased neuronal metabolic activity and estrogen receptors in the vertical limb of the diagonal band of Broca in Alzheimer's disease: relation to sex and aging. **Experimental neurology**, Amsterdam, v. 183, p. 159–172, set. 2003.
- ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.. **Brain Research. Molecular Brain Research**, Kodaira, v. 1, p. 1-9, jun. 1998.
- JIMENEZ, S. et al. Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. **The Journal of Neuroscience**, Sevilla, v. 28, p. 11650 –11661, nov. 2008.
- KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological Disease**, Berlin-Buch, v. 91, p. 461-553, abr. 2011.
- LEE, J. et al. Targeting estrogen receptors for the treatment of Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, Yongin, v. 49, p. 39–49, fev. 2014.
- LIU, X. et al. Estradiol attenuates tau hyperphosphorylation induced by upregulation of protein kinase-A. **Neurochemical Research**, Wuhan, v. 33, p. 1811–1820, set. 2008.
- MASTERS, C. L. et al. Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, Melbourne, v. 1, out. 2015.
- MCGEER, E.G.; MCGEER, P.L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. **Journal of Alzheimer Disease**, Vancouver, v. 19, p. 355–361, dez. 2010.
- MCGEER, P. L. et al. Immune system response in Alzheimer's disease.. *The Canadian journal of neurological science.*, Vancouver, v. 16, p. 516-527, nov. 1989.
- MINATTI, L. et al. Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review.. **American journal of Alzheimer's disease and other dementias**, [S.L], v. 24, p. 95-121,

abr./mai. 2009.

NORTON, S. et al. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. **The Lancet**, Londres, v. 13, p. 788-794, ago. 2014.

ODDO, S. et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. **Neuron**, Irvine, v. 39, p. 409–421, jul. 2003.

PAECH, K. et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. **Science**, San Francisco, v. 277, p. 1508–1510, set. 1997.

PEREGO, C.; FUMAGALLI, S.; SIMONI, M. G. De. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. **Journal of neuroinflammation**, Milão, v. 10, dez. 2011.

PISANU, A. et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, Cagliari, v. 71, p. 280-291, ago. 2014.

POMPILI, A; ARNONE, B; GASBARRI, A. Estrogens and memory in physiological and neuropathological conditions. **Psychoneuroendocrinology**, L'Aquila, v. 37, p. 1379–1396, set. 2012.

PÉREZ, S. E; CHEN, E.-Y; MUFSON, E. J.. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. **Developmental brain research**, Chicago, v. 145, p. 117–139, out. 2003.

REITZ, Christiane; BRAYNE, Carol; MAYEUX, Richard. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, Nova York, v. 7, p. 137-152, mar. 2011.

RODRIGUEZ, I. et al. Mouse Vaginal Opening Is an Apoptosis-Dependent Process Which Can Be Prevented by the Overexpression of Bcl2. **Developmental Biology**, Geneva, v. 184, p. 115–121, mai. 2002.

RUITENBERG, A. et al. Incidence of dementia: does gender make a difference?. **Neurobiology of aging**, Rotterdam, v. 22, p. 575–580, jul./ago. 2011.

SALLOWAY, S. et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease.. **Neurology**, Providence, v. 73, p. 2061-2070, dez. 2009.

SCHEFF, S. et al. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Neurobiology of Aging**, Lexington, v. 27, p. 1372-1384, out. 2006.

SCHEFF, S. et al. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Neurology**, Lexington, v. 68, n. 18 1501-1508, p. 1501-1508, mai. 2007.

SELKOE, D. et al. The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Massachusetts, v. 17, p. 57-64, jan. 1996.

SEUBERT, P. et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids.. **Nature**, San Francisco, v. 24, p. 325-327, set. 1992.

SEUBERT, P. et al. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide.. **Nature**, San Francisco, v. 21, p. 260-263, jan. 1993.

SHOJI, M. et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing.. **Science**, Maebashi, v. 258, p. 126-129, out. 1992.

STRUBLE, R. G. et al. Is brain amyloid production a cause or a result of dementia of the Alzheimer's type?. **Journal of Alzheimer's Disease**, Springfield, v. 22, p. 393-399, mai. 2010.

VARNUM, Megan M.; IKEZU, Tsuneya. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Polônia, v. 60, p. 251-266, ago. 2012.

VOLOBOUEVA, L. A.; GIFFARD, R. G.. Inflammation, mitochondria, and the inhibition of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research*, California, v. 89, p. 1989-1996, dez. 2011.

WANG, C. et al. Estrogen receptor- α is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, Changsha, v. 6, dez./fev. 2016.

WHARTON, W. et al. Short-term hormone therapy with transdermal estradiol improves cognition for postmenopausal women with Alzheimer's disease: results of a randomized controlled trial. **Journal of Alzheimer's disease**, Madison, v. 26, p. 495-505, abr. 2011.

WONG, P. C. et al. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases.. *Nature Neuroscience*, Baltimore, v. 5, p. 633-639, jul. 2002.

XU, H. et al. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. **Nature medicine**, Nova York, v. 4, p. 447-451, abr. 1998.