

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

FRANCIELLE GONÇALVES MINA

**LIRAGLUTIDA EM UM MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA DO TIPO
ALZHEIMER INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE βA_{1-42} EM
CAMUNDONGO: EFEITO NA MEMÓRIA, NEUROINFLAMAÇÃO,
DIFERENÇA ENTRE SEXOS E IDADE**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2017

FRANCIELLE GONÇALVES MINA

**LIRAGLUTIDA EM UM MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA DO TIPO
ALZHEIMER INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE βA_{1-42} EM
CAMUNDONGO: EFEITO NA MEMÓRIA, NEUROINFLAMAÇÃO,
DIFERENÇA ENTRE SEXOS E IDADE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane Budni

Coorientador: Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2017

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre me dar forças diante dos obstáculos, por sempre iluminar meu caminho, me fazendo persistir, e mesmo quando os dias pareciam obscuros, sempre trazendo esperanças de um amanhã melhor.

Agradeço aos meus pais *Jorge Mina e Rosa Mina*, sempre incentivando e acreditando nos meus objetivos, nunca desistiram de mim e dos meus sonhos.

Ao meu marido, William Bertan, que mesmo pela distância e o momento difícil que estamos passando, sempre esteve e está ao meu lado, apoiando, torcendo. Com você consegui chegar até o final, apesar das dificuldades e das lágrimas. Obrigada pelo amor, companheirismo e amizade.

Agradeço aos meus irmãos e sobrinhos, pela amizade e confiança que sempre tivemos uns aos outros, onde assim formamos uma família unida, linda!!

Ao pessoal do neurolab, em especial a Unidade de Neurodegeneração. Aos “ics” do laboratório, Aline, Gustavo, Eduarda, Malú, Ariande, Natália, Júlia, Afonso.

As amigas de doutorado, Michelle Garcez, Tatiani Belletini, Ana Carolina Falchett e Cenita Pereira Borges. A vocês, muito obrigada pela amizade, carinho, atenção. Agradeço imensamente, por fazerem parte dessa etapa.

E por último, não menos importante, a professora e orientadora, Josiane Budni, agradeço pela sua amizade, confiança. É e foi um prazer estar ao seu lado, e poder dispor de todo seu conhecimento, experiência, carinho, confiança. Esteve ao meu lado em vários dias de experimento, principalmente na indução do modelo animal de DA, e acima de tudo sempre disposta a ensinar, explicar e fazer estatística. Admiro-te pela pessoa, por sua simplicidade e principalmente pela humildade, e isto que aprendi com você quero levar para minha vida e profissão. A você, minha mais sincera e eterna gratidão.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, caracterizada por uma perda progressiva de neurônios, levando a uma perda acentuada de memória. A principal fisiopatologia da DA é o acúmulo do peptídeo β -amilóide (β A) e a formação dos emaranhados neurofibrilares, causado pela hiperfosforilação da tau. Atualmente, estudos indicam que a Diabetes mellitus 2 (DM2) e DA apresentam mecanismos biológicos semelhantes, tais como, disfunção na sinalização da insulina, neuroinflamação e perda de memória. Até o momento, sabe-se que o tratamento para a DA é apenas paliativo, não interrompe a progressão da doença. Além disso, sabe-se que mulheres apresentam maiores riscos para o desenvolvimento de DA. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da liraglutida, um agonista do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1, sobre a memória espacial, memória de habituação ao campo aberto e neuroinflamação em camundongos Black C57/BL6 machos ou fêmeas, com 3 ou 12 meses de idade. Para isso, o experimento foi dividido em duas etapas: etapa 1 corresponde aos animais com 3 meses de idade e etapa 2, aos animais com 12 meses de idade. Primeiramente foi realizada uma curva dose-resposta na Etapa 1. Os animais foram submetidos à administração de oligômeros β A₁₋₄₂ (O β A₁₋₄₂ - 400pmol) intracerebroventricular (i.c.v.). Decorridas 24 horas da administração de O β A₁₋₄₂ foi iniciado o tratamento via subcutânea (s.c) com liraglutida (0,001 mg/kg, 0,01 mg/kg ou 0,1 mg/kg) durante 17 dias. Foi avaliada a memória espacial pelos testes de labirinto octogonal e labirinto em Y e a memória de habituação no campo aberto, e no 18º dia, 24 horas após a última administração de liraglutida, os animais foram mortos e o hipocampo foi dissecado para análises dos níveis de citocinas (fator de necrose tumoral α - TNF α -, Interleucina 1 β - IL-1 β -, IL-4 e IL-10). Os animais machos com 3 meses que receberam administração i.c.v de O β A₁₋₄₂ mostraram dano na memória espacial tanto no labirinto octogonal quanto no labirinto em Y e na memória de habituação ao campo aberto. O tratamento com liraglutida (0,001 e 0,01 mg/kg) reverteu o dano da memória espacial. Na memória de habituação ao campo aberto, o tratamento com liraglutida (0,01 e 0,1 mg/kg), reverteu o dano induzido pelo O β A₁₋₄₂. Já nas fêmeas, os animais que receberam O β A₁₋₄₂ tiveram dano somente no tempo, mas não nos erros totais para encontrar a recompensa, indicando dano na memória espacial, e também apresentaram dano na memória de habituação ao campo aberto e liraglutida (0,01 e 0,1 mg/kg) foi capaz de reverter esse dano. Nos parâmetros inflamatórios, nos machos, liraglutida (0,01 mg/kg) sozinha e O β A₁₋₄₂, induziram aumento dos níveis de TNF- α e liraglutida (0,001 e 0,01 mg/kg) reverteu o efeito induzido pelo O β A₁₋₄₂. Já nas fêmeas, o O β A₁₋₄₂ induziu aumento dos níveis de TNF α , IL-1 β , IL-4 e IL-10, e o tratamento com liraglutida (0,01 e 0,1mg/kg) reverteu este efeito. Nos animais com 12 meses de idade, foi realizado o tratamento com liraglutida (0,01 mg/kg), dose com melhor resposta em animais com 3 meses. Foi possível observar que nos machos, a liraglutida reverteu o dano na memória espacial (tempo para encontrar a comida) causado pelo envelhecimento e pelo O β A₁₋₄₂ no último dia do teste do labirinto octagonal. A liraglutida também reverteu o dano na memória espacial, avaliada no labirinto em Y, causado pelo O β A₁₋₄₂. Na memória de habituação, a liraglutida reverteu o dano do envelhecimento (somente no parâmetro cruzamentos). Quanto às citocinas, o tratamento com 0,01 mg/kg de liraglutida, diminuiu os níveis de IL-4 e IL-10 nos animais que receberam injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂. Já nas fêmeas com 12 meses de idade, no labirinto octogonal e em Y, não houve diferença entre os grupos. Porém na habituação ao campo aberto, o tratamento com liraglutida conseguiu melhorar a memória de habituação. Já nos níveis de citocinas, o tratamento com 0,01 mg/kg de liraglutida, diminuiu os níveis de TNF- α , IL-4 e IL-10 causados pelos O β A₁₋₄₂. Os resultados apresentados mostram que a liraglutida apresenta efeito protetor, em machos e fêmeas com 3 ou 12 meses submetidos ao modelo animal de demência induzido pelos O β A₁₋₄₂. Este estudo é pioneiro em mostrar o efeito do tratamento com liraglutida em

machos e fêmeas. Neste sentido, este estudo mostra a importância dos estudos sobre as diferenças comportamentais entre os sexos nas doenças e em seus tratamentos.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Neuroinflamação; Liraglutida; Envelhecimento.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, characterized by a progressive loss of neurons, leading to a marked loss of memory. The main pathophysiology of AD is the accumulation of β -amyloid peptide (β A) and the formation of neurofibrillary tangles caused by hyperphosphorylation of tau. Currently, studies indicate that Diabetes mellitus 2 (DM2) and AD present similar biological mechanisms, such as, dysfunction in insulin signaling, neuroinflammation and memory loss. To date, it has been known that treatment for AD is only palliative, does not interrupt the progression of the disease. In addition, it is known that women present greater risks for the development of AD. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, in the spatial memory, habituation memory to open field and neuroinflammation in male or female Black C57 / BL6 mice with 3 or 12 months old. For this, the experiment was divided in two steps: step 1 corresponds to the animals with 3 months of age and step 2, to the animals with 12 months of age. Firstly, in Step 1, a dose-response curve was performed. The animals were subjected to intracerebroventricular (i.c.v.) β A₁₋₄₂ (β A₁₋₄₂O-400pmol) oligomers administration. After 24 hours of β A₁₋₄₂O administration, treatment with liraglutide (0.001 mg/kg, 0.01 mg/kg or 0.1 mg/kg) was started subcutaneously (s.c.) for 17 days. The spatial memory was evaluated on the radial maze and Y maze tests and habituation memory in the open field. In the 18th day, 24 hours after the last administration of liraglutide, the animals were killed, and the hippocampus was dissected for analysis (tumor necrosis factor α -TNF α -, Interleukin 1 β -IL-1 β -, IL-4 and IL-10). The 3-month-old male animals that received i.c.v. administration of β A₁₋₄₂O showed spatial memory damage in both the radial maze and Y maze tests and habituation memory damage in the open field test. Liraglutide treatment (0.001 and 0.01 mg/kg) reversed the spatial memory damage. In the habituation memory to open field, the liraglutide treatment (0.01 and 0.1 mg/kg) reversed the β A₁₋₄₂O damage. In females, animals that received β A₁₋₄₂O had damage not only in time but not in total errors to find reward, indicating damage in spatial memory, and also presented damage in habituation memory to open field and liraglutide (0, 01 and 0.1 mg/kg) reversed this damage. In the male inflammatory parameters, liraglutide (0.01 mg/kg) alone and β A₁₋₄₂O, induced high levels of TNF- α and liraglutide (0.001 and 0.01 mg/kg) reversed this effect. In females, β A₁₋₄₂O induced increase of TNF α , IL-1 β , IL-4 and IL-10 levels, and liraglutide treatment (0.01 and 0.1mg/kg) reversed this effect. In 12-month-old male, liraglutide treatment (0.01 mg/kg), the dose with the best response in 3-month-old animals, was performed. It was observed that in males, liraglutide reversed the spatial memory damage (time to find food) caused by aging and β A₁₋₄₂O on the last day of the radial maze test. Liraglutide also reversed spatial memory damage, assessed in the Y maze caused by β A₁₋₄₂O. In habituation memory, liraglutide reversed the aging damage (only in the crossing parameter). As for cytokines levels, liraglutide treatment, 0.01 mg/kg, decreased the IL-4 and IL-10 levels in the animals that receiving i.c.v injection of β A₁₋₄₂O. In 12-month-old female, in the radial maze and Y maze, there was no difference between the groups. However, in habituation memory to the open field, the liraglutide treatment was able to improve habituation memory. While in the cytokine levels, the liraglutide treatment 0.01 mg/kg decreased the TNF- α , IL-4 and IL-10 levels caused by β A₁₋₄₂O. The results show that liraglutide has a protective effect in 3 or 12-month old males and females subjected to animal model of dementia induced by β A₁₋₄₂O. This study is pioneer in showing the effect of liraglutide treatment in males and females. In this sense, this study shows the importance of studies on the behavioral differences between the sexes in diseases and their treatments.

Key words: Alzheimer disease, Neuroinflammation, Liraglutide, Aging

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Formação do peptídeo β A.....	19
Figura 2: Disfunção na sinalização na doença de Alzheimer (DA).	23
Figura 3: Diferença nas respostas imunes, transtornos e doenças entre homens e mulheres..	25
Figura 4: Linha do tempo do protocolo experimental da etapa 1.....	32
Figura 5: Linha do tempo do protocolo experimental da etapa 2.....	33
Figura 6: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste do labirinto octagonal em camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	39
Figura 7: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste de habituação ao campo aberto em camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	41
Figura 8: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste de Labirinto em Y em camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	43
Figura 9: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 em hipocampo de camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	44
Figura 10: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste do labirinto octagonal em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	46
Figura 11: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste de Habituação ao campo aberto em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	48
Figura 12: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste de Labirinto em Y em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	50
Figura 13: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 em hipocampo de camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	52

Figura 14: Efeito do tratamento com Liraglutida (0,01mg) no teste do labirinto octagonal em camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	53
Figura 15: Efeito do tratamento com Liraglutida (0,01mg) no teste de Habituação ao campo aberto em camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	55
Figura 16: Efeito do tratamento de Liraglutida (0,01mg) no teste de Labirinto em Y em camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	56
Figura 17: Efeito do tratamento de Liraglutida (0,01mg) nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 em hipocampo de camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	58
Figura 18: Efeito do tratamento com Liraglutida (0,01mg) no teste do labirinto octagonal em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	59
Figura 19: Efeito do tratamento com Liraglutida (0,01mg) no teste de Habituação ao campo aberto em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	61
Figura 20: Efeito do tratamento de Liraglutida (0,01mg) no teste de Labirinto em Y em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	62
Figura 21: Efeito do tratamento de Victoza (0,01mg) nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 em hipocampo de camundongos machos C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.	64
Figura 22: Resultados da Etapa 1.	74
Figura 23: Resultados da Etapa 2.	75

LISTA DE ABREVIACÕES

ACSF - Líquido cefalorraquidiano artificial (do inglês, *artificial cerebrospinal fluid*)

Ach - Acetilcolina

AKT – Serina-treonina quinase

AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ANOVA - Análise de variância (do inglês, *analysis of variance*)

ApoE - Apolipoproteína E

APP - Proteína precursora amiloide (do inglês, *amyloid precursor protein*)

BHE – Barreira hematoencefálica

CA1 - Região CA1 do Hipocampo (do inglês, *hippocampal CA1 region*)

CA3 - Região CA3 do Hipocampo (do inglês, *hippocampal CA2 region*)

CAT - Catalase

CONCEA - Conselho nacional de controle de experimentação animal

CD36 - Proteína de diferenciação CD36 (do inglês, *cluster of differentiation*)

COX-2 – Ciclo oxigenase 2

cAMP - Adenosina 3',5'monofosfato cíclico

DA - Doença de Alzheimer

DM2 – Diabetes mellitus 2

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERK1/2 – Proteína MAP quinases ERK1/2

GPx – Glutathiona Peroxidase

GR – Glutathiona reduzida

GLP-1 – Glucagon 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-18 - Interleucina 18

iNOS - óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *nitric oxide synthase*)

IRS-1 – Substrato 1 do receptor de insulina (do inglês, *insulin receptor substrate*)

IFN- α – Interferon alfa

LTP - Potencial de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*)

LTD - Depressão de longa duração (do inglês, *long-term depression*)

NF- κ B - Fator nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa B*)

NFT - Emaranhados neurofibrilares (do inglês, *neurofibrillary tangles*)

NLRP3 - do inglês, *oligomerization domain-like receptor family pyrine domain-containing 3*

NMDA - N-Metil-D-Aspartato

mGluR5 – Receptor metabotrópico 5 de Glutamato (do inglês, *metabotropic glutamate receptor 5*)

MDA – Malondealdeído

MPO – Mieloperoxidase

O β A – Oligômeros β -amilóide

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido Dismutase

PKA – Proteína kinase A

PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase

PKB – Proteína quinase B

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

TLR7 – receptores toll-like 7 (do inglês, *toll-like receptor 7*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (do inglês, *tumor necrosis fator- α*)

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

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

β A - beta-amilóide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Doença de Alzheimer.....	16
1.2 Fisiopatologia da DA	17
1.2 DA e DM2	21
1.3 Diferenças de sexos na resposta neuroquímica e comportamental a diferentes estímulos	24
1.5 Tratamento para DA	26
1.6 Liraglutida.....	27
1.7 Justificativa	28
2. Objetivos	29
2.1 Objetivos Gerais	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. Materiais e métodos	30
3.1 Animais.....	30
3.2 Indução do modelo animal de demência tipo DA induzido pela administração de oligômeros βA_{1-42}	30
3.3 Tratamento e desenho experimental	31
3.3.1 Etapa 1	32
3.3.2 Etapa 2	33
3.4 Testes comportamentais.....	34
3.4.1 Campo aberto	34
3.4.2 Labirinto em Y	34
3.4.3 Labirinto octagonal	35
3.5 Análises Imunoquímicas por ensaio enzimático.....	36
3.6 Análises Estatísticas.....	36
4. RESULTADOS	38
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERENCIAS	77
8. ANEXO A.....	97
9. ANEXO B	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

O envelhecimento é compreendido como um processo natural e complexo, sendo caracterizado por uma perda progressiva da integridade fisiológica do organismo, levando a uma maior vulnerabilidade e à morte celular (Minciullo et al., 2016). Esta condição, torna o indivíduo susceptível a fatores de riscos para patologias humanas, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Lopez-Otin et al., 2013). A Organização Mundial da Saúde reconhece, que o envelhecimento da população em muitos países é um dos desafios mais importantes do século XXI. Estima-se que, até 2050, o número de pessoas com mais de 60 anos de idade no planeta aumentará de 1 bilhão a 2 bilhões (WHO, 2015). Em conjunto a esse novo cenário mundial, o envelhecimento está associado a déficits cognitivos, declínio nas funções executivas, juntamente com distúrbios motores e sensoriais que podem ser atribuídos a déficits da neurotransmissão colinérgica (Abhijit et al., 2017; Lavrencic et al., 2017). Além disso, recentemente, estudos vem mostrando que o envelhecimento está acompanhado por uma inflamação crônica de baixo grau, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como Parkinson e Alzheimer (Minciullo, et al., 2016; Jose et al., 2017; Lavrencic, et al., 2017; Watson et al., 2017).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, muito relacionada ao envelhecimento, que afeta a memória e comportamento (2016 Alzheimer's disease facts and figures, 2016; Yi L. et al., 2017). Foi descrita primeiramente em 1907 por Alois Alzheimer (Selkoe, 2001), através de análises histológicas observadas, em autópsia de cérebro de uma paciente, é considerada uma das demências mais comum no mundo. Segundo a Associação mundial da DA, estimou-se que 5,2 milhões de pessoas com idade acima de 65 anos tiveram o diagnóstico de DA e custo total para o cuidado foi demonstrado ser de 200 bilhões de dólares em 2012 (2012 Alzheimer's disease facts and figures, 2012). O processo fisiopatológico da doença é marcado pela acentuada perda neuronal, resultando na diminuição das sinapses, consequentemente levando a morte celular, estresse oxidativo e uma forte resposta inflamatória. Ainda, apresenta uma redução significativa de neurônios colinérgicos que conduzem a uma perda de acetilcolina (ACh) e alterações nos receptores glutamatérgicos resultando em excitotoxicidade (Li S. et al., 2011). Estas disfunções (Lilja et al., 2013) contribuem para o

dano cognitivo, perda de memória, sintomas depressivos, distúrbios comportamentais, alucinações e agitações (Burns et al., 1990; Barage e Sonawane, 2015; Madeira et al., 2015; Yi J. H. et al., 2017). Além disso, estas alterações neuropatológicas são acompanhadas por uma atrofia acelerada do córtex, hipocampo e lobos parietais (Morris et al., 2014; Chuang et al., 2017; Risacher et al., 2017).

1.2 Fisiopatologia da DA

A etiologia da doença ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que múltiplos fatores ambientais e genéticos estão envolvidos como: idade, sexo, histórico familiar, educação, depressão, hipertensão, diabetes, hiperlipidemia, baixa atividade física e cognitiva, hábitos de vida e medicamentos (Schipper, 2011).

Dentre as principais características fisiopatológicas descritas na DA, encontram a presença de peptídeo β -amilóide (β A), formado pela clivagem da proteína percussora β -amilóide (APP), e os emaranhados neurofibrilares, formados pela hiperfosforilação da proteína tau, uma proteína responsável por estabilizar os microtúbulos (Cox et al., 2016; Ji et al., 2016). Acredita-se que as placas β -amilóides e os emaranhados neurofibrilares são as principais características desta doença, sendo acompanhada por uma marcante atrofia e perda de neurônios cerebrais (Nimmrich e Ebert, 2009). A deposição de peptídeo β A é predominantemente encontrada em placas senis no parênquima cerebral de pacientes com DA quando comparado com indivíduos saudáveis (Mawuenyega et al., 2010; Thal et al., 2015; Kapasi et al., 2017; Tachibana et al., 2017).

A APP é uma glicoproteína transmembranar, formada por 365-770 aminoácidos, altamente expressa em tecidos neuronais humanos (Serrano-Pozo et al., 2011; Chun et al., 2015; Sinha et al., 2015; Ikram et al., 2017). Esta proteína sofre uma clivagem complexa por γ - ou β -secretases que iniciam duas vias diferentes, não-amiloidogênica e amiloidogênica, respectivamente, como demonstrado na figura 1. Na via não-amiloidogênica, APP é clivada por α e γ secretases, resultando na produção de um domínio solúvel de APP (sAPP α) (Selkoe e Schenk, 2003). Na via amiloidogênica, APP é clivada por β -secretase, gerando um fragmento C-terminal que posteriormente, é clivada por γ secretase que então produz um fragmento de peptídeo β A (Barage e Sonawane, 2015; Sengupta et al., 2017). A toxicidade β A afeta diretamente a plasticidade sináptica antes da formação de placas amiloides e dos emaranhados

neurofibrilares (Selkoe, 2002; Selkoe e Hardy, 2016). Em camundongos transgênicos para APP, foi observado que a hiperfosforilação da tau ocorreu após o acúmulo de β A (Lewis et al., 2001), mostrando que na fisiopatologia da DA, o primeiro passo é a toxicidade causada pelo β A. Em cultura de células neuronais foi também observado, que primeiro há um aumento do acúmulo de β A e depois uma alteração da tau, sugerindo então que a toxicidade de β A acontece nas fases iniciais da DA (Shi Y. et al., 2012; Choi et al., 2014; Muratore et al., 2014; Moore et al., 2015). Estudos mostram que oligômeros β A ($O\beta$ A) podem causar disfunção e neurotoxicidade nos receptores de glutamato bem como no receptor metabotrópico de glutamato tipo 5 (mGluR5), podendo também interagir com os receptores inotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Ferreira et al., 2015). Isso pode induzir aumento do influxo de cálcio levando à neurotoxicidade, assim como estimular excessivamente receptor NMDA, levando ao dano cognitivo observado tanto em pacientes com DA quanto em modelos animais (Renner et al., 2010; De Felice et al., 2014; Liang et al., 2017). Em modelos animais triplo transgênicos para a DA (3xTg-DA), mostram que a disfunção do receptor NMDA e da plasticidade sináptica foi associado ao aumento da expressão de $O\beta$ A, sem a formação de placas (Oddo et al., 2003; Tozzi et al., 2015). Além do mais, resultados com cultura de células neuronais mostram que concentrações nanomolares de $O\beta$ A, é fundamental para inibir a plasticidade sináptica, incluindo a potenciação de longa duração (LTP) e potenciação de longa depressão (LTD) (Kessels et al., 2010; Jo et al., 2011; Sinnen et al., 2016).

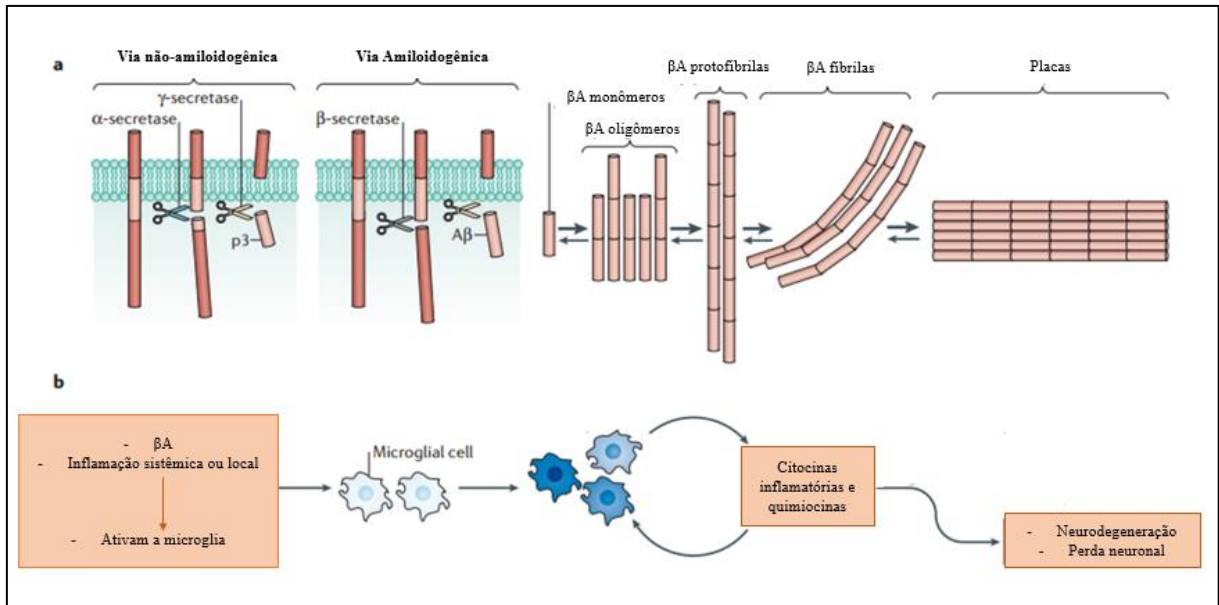


Figura 1: Formação do peptídeo β A. A proteína precursora amiloide (APP) é uma proteína transmembrana, que pode sofrer uma clivagem por enzimas secretases. Quando a APP é clivada por α -secretase no meio do domínio β -amilóide (β A), não há a formação de oligômeros β A. Porém, quando APP é clivada por enzimas β - e γ -secretases, são liberados os peptídeos β A, que podem se acumular formando oligômeros, fibrilas e placas (a). A formação de oligômeros β A (O β A), podem prejudicar a função sináptica nos neurônios, e simultaneamente desencadear uma resposta inflamatória local, pela ativação da micróglia que produz citocinas e quimiocinas inflamatórias (b). Ao longo do tempo, essas alterações bioquímicas e produção de citocinas subsequentes causadas pelo O β A levam à morte neuronal, atrofia cerebral e neurodegeneração, características típicas da DA. Fonte: adaptado (Heppner et al., 2015).

Outra característica importante encontrada na DA, é a presença de emaranhados neurofibrilares, formados pela hiperfosforilação da proteína tau, expressa principalmente em neurônios e axônios, regulando e estabilizando os microtúbulos (Spillantini e Goedert, 2013). A hiperfosforilação da tau faz com que a função dos microtúbulos seja comprometida, e isso diminui o transporte axonal e eventualmente causa uma disfunção sináptica e perda neuronal (Jaworski et al., 2010). Do mesmo modo, as moléculas da proteína tau hiperfosforilada tendem a se agrupar em filamentos helicoidais emparelhados, formando os emaranhados neurofibrilares (ENF) (Danysz e Parsons, 2012). A enzima glicogênio sintase-quinase 3 β (GSK-3 β) desempenha um papel central na hiperfosforilação da tau (Gong C. X. e Iqbal, 2008). Uma vez que a fosforilação da tau pela GSK3 β , aumenta a atividade de tau, levando a formação dos emaranhados neurofibrilares (Hernandez et al., 2010; Maqbool et al., 2016).

A inflamação desempenha um papel crítico na patogênese da DA (Ferreira Sergio T. et al., 2014). Vários estudos estabeleceram a presença de marcadores inflamatórios no cérebro de pacientes com DA, incluindo níveis elevados de citocinas/quimiocinas e microgliose (Britschgi e Wyss-Coray, 2007; Swardfager et al., 2010; Czirr e Wyss-Coray, 2012; Ferreira

Sergio T., et al., 2014). Resultados de Bermejo (2008) mostrou aumento dos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e ciclooxigenase-2 (COX-2) em pacientes com DA e com comprometimento cognitivo leve, evidenciando um aumento da inflamação nas fases iniciais de DA. Além do mais, no sangue de pacientes com DA também foram encontrados níveis de vários mediadores inflamatórios aumentados, incluindo o TNF- α , interleucina-6 (IL-6) e IL-1 β (Swardfager, et al., 2010). Estudos vem demonstrando a ativação da micróglia e produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-6 na DA (Heneka, 2014, (Montine et al., 2001; Heneka, Golenbock, et al., 2015)). A ativação da microglia também induz a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (ON) (Heneka et al., 2001; Heneka, Carson, et al., 2015; Heneka, et al., 2015).

Outra hipótese que está ganhando destaque é a ativação de receptores *toll like* (TLR) pelas fibrilas β A. Os TLR são um tipo de moléculas de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), e então desencadeiam uma resposta imune (Meylan et al., 2006; Brubaker et al., 2015; Kordjazy et al., 2017). As fibrilas β A podem reconhecer TLR4-TLR6 / CD36, resultando na sinalização do fator de transcrição nuclear κ β (NF- κ B) (Stewart et al., 2010). O estímulo da micróglia por O β A pode ser semelhante à ativação do lipopolissacarídeo (Heneka, et al., 2015), podendo então causar danos cerebrais como perda de sinapses e estresse celular (Floden e Combs, 2006; Sondag et al., 2009; Dhawan et al., 2012; Lourenco et al., 2013).

Atualmente, resultados mostram participação do inflamassoma na neuroinflamação na DA e em outras doenças neurodegenerativas (Volt et al., 2016; Alegre et al., 2017; Fenini et al., 2017). O inflamassoma é um complexo multiproteico, mediado por ativação da inflamação através de caspases e assim induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Man et al., 2016; Favero et al., 2017; Fenini, et al., 2017). Modelos animais de DA, já evidenciaram a ativação do inflamassoma NLPR3, com produção de citocinas e quimiocinas (Heneka et al., 2013; Shi J. Q. et al., 2013; Liu e Chan, 2014; Couturier et al., 2016), ressaltando uma forte relação do inflamassoma com os processos inflamatórios que ocorrem na DA. Um estudo recente, postulou que a DA acontece muito antes das formações de placas β A, sem manifestações clínicas evidentes, começando por uma pequena inflamação, que progride com o avanço da doença, culminando em uma resposta inflamatória e imune (Cuello, 2017).

Outro mecanismo fisiopatológico presente na DA é o estresse oxidativo. Resultados de Casado (2008) mostraram uma diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) em pacientes com DA (Casado et al., 2008). Aumento dos níveis de MDA foi verificado no córtex temporal, hipocampo e córtex occipital de pacientes com DA (Palmer e Burns, 1994; Lovell et al., 1995; Marcus et al., 1998; DiCiero Miranda et al., 2000). Um recente estudo demonstrou carbonilação de proteínas nas fases iniciais de pacientes com DA, mostrando a relação do estresse oxidativo com a progressão da doença (Di Domenico et al., 2016). Além do mais, estudos já demonstraram aumento dos níveis de carbonilação de proteínas no hipocampo e giro denteado em pacientes com DA (Hensley et al., 1995; Aksenov et al., 2001). O acúmulo do peptídeo β A, disfunção mitocondrial e diminuição do aporte energético estão envolvidos com as fases iniciais de pacientes com DA (Radi et al., 2014). Em modelo animal transgênico para DA (APP), foi visto aumento dos níveis de EROS e disfunção mitocondrial nas fases iniciais da doença (Fang et al., 2016). Outro estudo, também mostrou, em um modelo animal da DA induzido pela administração de estreptozotocina, aumento dos níveis de MDA, diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT (Hassanzadeh et al., 2015). Mais uma vez mostrando o papel do estresse oxidativo na DA.

Vários fatores estão envolvidos na patogênese de DA, mas nos últimos anos tem-se evidenciado mecanismos de disfunção da insulina encontrados na diabetes melitus tipo 2 (DM2) e também na DA. Curiosamente, alguns resultados e autores acreditam que a disfunção da insulina presente no DM2, ocorre na DA, sendo a DM2, um risco para o desenvolvimento de DA (Butterfield et al., 2014; Dominguez et al., 2014; Bassiony et al., 2015; Greene et al., 2015; Muratli et al., 2015; Sandhir e Gupta, 2015; Shpakov, 2015; Luo et al., 2016).

1.2 DA e DM2

A DM2 é responsável por cerca de 90% de todos os casos de diabetes, e é caracterizada por uma redução na capacidade da insulina de estimular a utilização de glicose (resistência à insulina) e inadequada secreção de insulina a partir das células β pancreática com consequente hiperglicemia (Correia et al., 2012; Perez-Losada et al., 2016). A prevalência e incidência de DM2 aumentou dramaticamente ao longo das últimas décadas juntamente com o aumento da obesidade da população associada ao estilo de vida ocidental, como a falta de exercício e dietas com alto teor calórico (Moreira, 2013). Como a DM2 avança sem tratamento

adequado, muitas complicações ocorrem, o que leva a um aumento do risco de mortalidade. Dentre as complicações, está relacionada uma taxa maior de déficits cognitivos em comparação com a população (Huang et al., 2015; Trento et al., 2015; Datusalia e Sharma, 2016; Raffield et al., 2016; van Bloemendaal et al., 2016). Estudos avaliando a estrutura cerebral, demonstraram uma atrofia cortical, subcortical e do hipocampo em pacientes DM2 (van Bussel et al., 2016). Evidências sustentam que a DM2 é um fator de risco para as demências como a demência vascular e a DA (Moreira, 2013; Hatanaka et al., 2015; Groeneveld et al., 2016).

Curiosamente, cérebros *post mortem* de pacientes com DA e DM2 apresentam anormalidades semelhantes incluindo disfunção metabólica, estresse oxidativo e neuroinflamação (Talbot et al., 2012; De Felice e Ferreira, 2014; Shpakov, 2015). Sendo assim, é possível que esses mecanismos semelhantes representem resistência periférica à insulina na DM2 e disfunção na sinalização da insulina no cérebro de pacientes com DA. Além do mais, estudos têm relacionado mecanismos neuropatogênicos desencadeados por β A, uma vez que estes podem estar envolvidos na resistência periférica à insulina no DM2 (Craft, 2012; Werner e LeRoith, 2014; Ma L. et al., 2015). Interessantemente, cérebros com DA apresentam alterações na ativação e sinalização da insulina, diminuindo a capacidade de resposta à este hormônio (Montine, et al., 2001; Steen et al., 2005; Talbot, et al., 2012; De Felice e Ferreira, 2014).

Os efeitos da insulina no SNC já estão bem estabelecidos (Labandeira-Garcia et al., 2017; Neth e Craft, 2017). Um dos primeiros estudos com insulina, verificaram que a concentração deste hormônio no fluido cerebrospinal aumentava conforme o aumento da sua concentração no plasma (Margolis e Altszuler, 1967). Outro estudo demonstrou a presença do receptor de insulina (IR) no SNC em ratos (Havrankova et al., 1978). A partir de então, os efeitos da insulina na plasticidade sináptica, apoptose, humor, memória, reprodução e crescimento tem ganhado destaque (Zhao et al., 2004; Plum et al., 2005; Avogaro et al., 2010; Abraham et al., 2014). Alguns estudos ainda sugerem que a insulina pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) através de carreadores, receptores ou ainda, a insulina pode passar para o SNC através de órgãos circumventriculares, que são livres de BHE (Akintola e van Heemst, 2015). A insulina modula a neurotransmissão glutamatérgica nas sinapses, induz o processo LTD, diminuindo a quantidade de receptores AMPA na membrana pós-sináptica. Além disso, este processo depende da fosforilação do receptor de insulina, com a ativação da enzima fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K) e de proteínas síntese (Nakamura et al., 2010). Outros autores relataram que a insulina também induz a fosforilação da subunidade do receptor de

glutamato tipo 2 (GluR2) nos receptores AMPA de neurônios do hipocampo, produzindo endocitose e uma diminuição na capacidade excitatória pós-sináptica (Ahmadian et al., 2004). Até o momento, sabe-se que a insulina em humanos modula a atividade neuronal do hipotálamo, e seus efeitos podem diminuir a obesidade (Matsuda et al., 1999; Smeets et al., 2005; Page et al., 2013; Heni et al., 2014; Little et al., 2014), assim como é largamente distribuída no hipocampo, bulbo olfatório, córtex total, cerebelo e amígdala, indicando seus vários efeitos em diversas regiões cerebrais (Duarte et al., 2012). Outra hipótese aceita, é que os O β A quando liberados causam uma endocitose de IRs. Isto foi visto em culturas de células neuronais, onde a exposição de neurônios ao β A, causaram uma diminuição de IR, assim como uma diminuição na sinalização de NMDA, conforme figura 2 (Zhao et al., 2008).

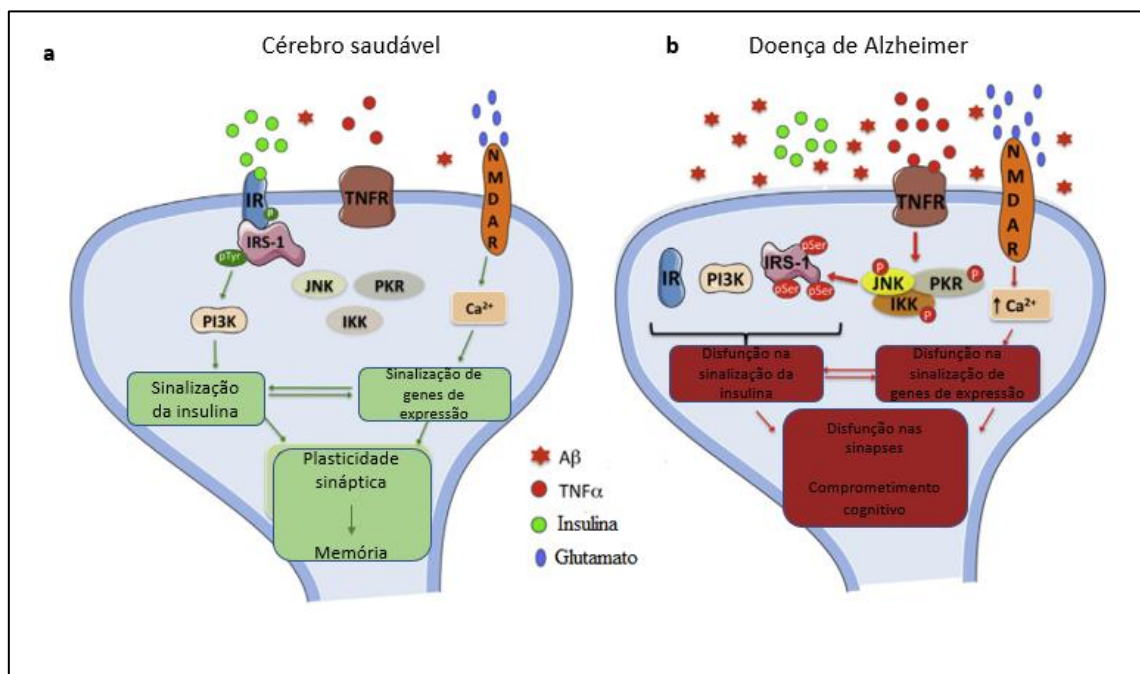


Figura 2: Disfunção na sinalização na doença de Alzheimer (DA). Na figura A, mostra a sinalização da insulina neuronal sob condições fisiológicas normais. A ligação de insulina ao seu receptor de superfície celular (receptor de insulina -IR) desencadeia autofosforilação e subsequente fosforilação em tirosina do substrato do IR tipo 1 (IRS-1). Isso resulta em ativação de fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) e respostas celulares que facilitam a plasticidade sináptica e a memória. O influxo de cálcio (Ca²⁺) através de receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) ativa a sinalização e expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica e na memória. Já a figura B, mostra a disfunção da insulina no cérebro com DA, o acúmulo de oligômeros β -amilóide (O β A) aumenta os níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a ativação de quinases por estresse tais como Janus cinase (JNK), Proteína quinase ativada por RNA de cadeia dupla (IKK), I kappa B cinase (IKK), resultando em fosforilação de serina inibitória do IRS-1. A ativação NMDARs por O β A resulta em influxo excessivo de Ca²⁺, estresse oxidativo neuronal e sinalização interrompida, levando a uma disfunção na plasticidade sináptica. Nessas condições, a ativação de proteínas tirosinas fosfatases podem inibir a sinalização do IRS-1, levando ao comprometimento das sinapses e à disfunção cognitiva. Fonte: adaptado de (De Felice, et al., 2014).

Portanto, uma vez que há semelhança no metabolismo entre as duas doenças, como que a DM2 pode ter o risco aumentado para DA? Estudos demonstram que na resistência à insulina periférica, a sinalização do TNF- α conduz à ativação da proteína *Janus* cinase (JNK) (Bomfim et al., 2012; Bhaskar et al., 2014). A ativação da via de TNF/JNK está ligada principalmente a processos inflamatórios e estresse. Uma vez ativada, esta via promove a fosforilação do resíduo de serina do IRS-1, inibindo assim a fosforilação de tirosina no IRS-1, bloqueando a sinalização da insulina. No DM2, elevados níveis de TNF- α induzem a fosforilação em resíduo de serina do IRS-1, bloqueando a sinalização de insulina (Jayaraman e Pike, 2014; Vieira et al., 2017). No cérebro, o TNF- α é produzido principalmente pelas células microgлияis em resposta à trauma, infecção ou acúmulo anormal de proteínas, e um recente estudo mostrou níveis aumentados de TNF- α em microvasos cerebrais e fluido cerebrospinal de pacientes com DA (Stamouli e Politis, 2016). Evidências iniciais demonstram que a disfunção na sinalização da insulina encontrada na DA, está ligada à sinalização inflamatória causada por O β A, por causar inibição de IRS-1 e ativação de TNF/JNK (De Felice e Ferreira, 2014).

Considerando toda patogênese comum entre DM2 e DA, ainda há outro aspecto importante da DA a ser considerado, a diferença de resposta na DA entre os sexos. Estudos atuais confirmam uma diferença na memória e aprendizagem entre machos e fêmeas. Ainda pode-se afirmar que um sexo tem maior prevalência e ou gravidade que outro sexo, assim como as doenças nos jovens e nos adultos demonstram respostas específicas a determinado gênero (Li R. e Singh, 2014; Dolle et al., 2017).

1.3 Diferenças de sexos na resposta neuroquímica e comportamental a diferentes estímulos

A diferença de sexos entre machos e fêmeas, homens e mulheres vem ganhando destaque no mundo científico (Hegarty, 2017). Até a última década, animais fêmeas eram excluídos das pesquisas científicas, com exceções para reproduções sexuais ou para investigações comportamentais específicas, por apresentarem o ciclo estral, que por sua vez poderia interferir nos testes comportamentais (Simpson et al., 2012). Evidências sugerem diferenças nos sexos à nível cerebral e comportamental, tanto nos estudos clínico quanto nos estudos pré-clínico. Muito embora, os hormônios sexuais podem desempenhar um papel importante na aprendizagem e na memória, podendo afetar a capacidade de respostas aos

tratamentos (Souza, 2014; Gobinath et al., 2017). De acordo com a literatura, homens apresentam uma maior incidência e predisposição para o desenvolvimento de autismo, transtorno de hiperatividade e atenção, assim como possuem maior habilidades na memória de espacial (Van Den Eeden et al., 2003; Wooten et al., 2004; Ramtekkar et al., 2010; Rucklidge, 2010), enquanto que mulheres estão mais predispostas ao desenvolvimento de depressão e DA, e maior habilidade nas memórias verbais (Fombonne, 2009; Werling e Geschwind, 2013; Idring et al., 2015), como demonstrado na figura 3. Uma outra área da ciência que vem ganhando maior atenção, é a diferença de sexo no tratamento com medicamentos, uma vez que homens e mulheres tem diferentes estados fisiológicos que irão influenciar na absorção e metabolização de fármacos. É necessário levar em consideração o sexo e o estado fisiológico ao avaliar a eficácia farmacológica de um determinado tratamento (Gartlehner et al., 2010). Estudos em animais já conseguiram ver a ação farmacológica em machos e fêmeas, onde o tratamento com diazepam (2,5mg/kg) para teste de ansiedade, aumentou o tempo de latência nos braços do plus maze em machos, mas não aumentou nas fêmeas. O mesmo foi visto no teste de nado forçado, onde o tratamento com desmipramina (2 mg/kg) diminuiu o tempo de imobilidade nos machos, mas não nas fêmeas (Joy Simpson 2012). Já o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg) por 21 dias aumentou a expressão de receptores mGlu2 em fêmeas, porém não em machos (Zammataro et al., 2017).

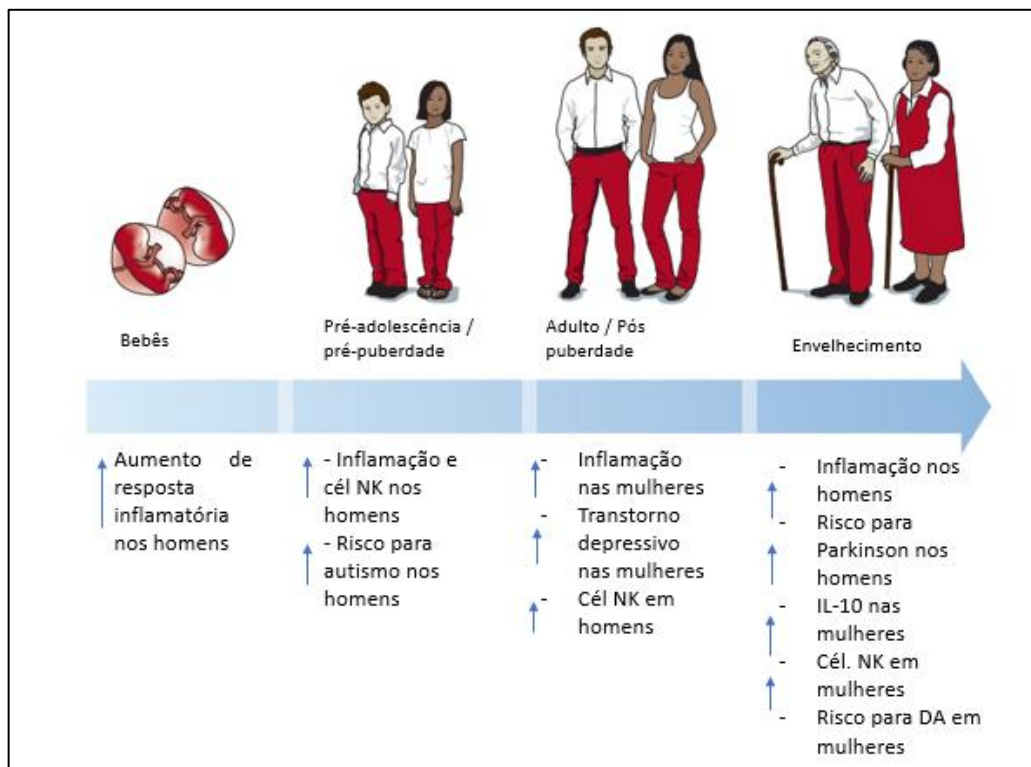


Figura 3: Diferença nas respostas imunes, transtornos e doenças entre homens e mulheres. Os fatores imunológicos e risco para desenvolver doenças e transtornos variam entre os sexos ao longo da vida. As diferenças

de sexo mudam na puberdade e depois diminuem na vida adulta, sugerindo efeitos hormonais. Por outro lado, fatores inflamatório na diferença entre sexos permanece constante desde o nascimento até o envelhecimento. A escassez de estudos nesta área é notável, principalmente no início da puberdade até o envelhecimento. Fonte: adaptado de (Klein, 2012).

Vários estudos epidemiológicos mostram que a neurodegeneração e os sintomas clínicos ocorrem mais rapidamente em mulheres, uma vez que se suspeite de um diagnóstico (Sinforiani et al., 2010; Hebert et al., 2013; Li R. e Singh, 2014; Kim et al., 2015; Laws et al., 2016). Embora a progressão da DA possa ser mais rápido entre as mulheres idosas, devido a vulnerabilidade neurológica na pós-menopausa (Li R. e Singh, 2014), estudo realizado nos Estados Unidos e no Reino Unido sugerem que homens com DA têm um tempo de sobrevivência mais curto. Mulheres são frequentemente diagnosticados anteriormente no curso da doença do que homens, o que poderia confundir a determinação da longevidade pós-diagnóstico (Todd et al., 2013; Kua et al., 2014; Podcasy e Epperson, 2016). Outro fator de grande importância na diferença de sexos, é que homens e mulheres, machos e fêmeas podem ter respostas imunes diferentes. De acordo com os resultados, o gene do receptor TLR7, codificado no cromossomo X, pode sofrer um inativação e ser mais expresso em mulheres do que em homens (Klein, 2012). Em culturas de células sanguíneas mononucleares, a exposição ao TLR7 aumentou os níveis de interferon- α (IFN- α) em mulheres quando comparado aos níveis dos homens (Berghofer et al., 2006; Pisitkun et al., 2006). Porém, a ativação de TLR9 por resposta viral, aumentou os níveis de IL-10 em homens mais do que em mulheres, avaliado por cultura de células sanguíneas (Torcia et al., 2012). Portanto, mais estudos são necessários para identificar os fatores precisos que medeiam as diferentes respostas imunes e os diferentes mecanismos fisiopatológicos de doenças entre homens e mulheres.

1.5 Tratamento para DA

A terapia farmacológica atualmente aprovada para a DA ainda não é efetiva, somente paleativa, pois promove temporária e modesta melhora cognitiva sem alterar o curso da doença ou o resultado final da mesma. As principais classes de fármacos utilizados na DA são: inibidores da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e antagonistas de receptores NMDA (Greig, 2015). Dentre os AChE encontram-se o donepezil, rivastigmina e a galantamina, primeira linha de fármacos utilizados para tratar a DA leve a moderada. O

donapezil pode ser utilizado também para o tratamento da DA severa (Chu, 2012; Sadowsky e Galvin, 2012). Dentre os antagonistas de receptores NMDA encontra-se o único fármaco, memantina, que é utilizado para a DA moderada a severa (Touchon et al., 2014; Greig, 2015; Saint-Laurent Thibault et al., 2015; Chen R., 2017). Além disso, é um fármaco relativamente seguro, com baixos efeitos colaterais (van Marum, 2009). Porém, a memantina não impede a progressão da doença, e dessa forma, mais estudos e, possivelmente, outras associações farmacológicas são necessárias para melhorar a eficácia do tratamento para DA. Até o momento, sabe-se que as mulheres tem maiores risco de desenvolver a DA do que os homens, e a progressão da doença deve-se levar em conta a resposta do tratamento em ambos os sexos (Podcasy e Epperson, 2016). Logo, não há registros na literatura que mostre resultados para o tratamento da DA em homens e mulheres, constatando que mais estudos precisam serem realizados nessa área.

1.6 Liraglutida

Liraglutida, conhecida comercialmente como Victoza[®], é um agonista do receptor do hormônio peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), facilitando a sinalização da insulina. O GLP-1 atua também como um fator de crescimento no cérebro, podendo induzir o crescimento e proteger contra lesão oxidativa em células neuronais (Perry et al., 2007). A deleção do receptor GLP-1 reduz o aprendizado de novas tarefas e a LTP no hipocampo (Abbas et al., 2009). Além disso, o GLP-1 tem mostrado reduzir níveis endógenos de β A em cultura de células neuronais, e em um modelo animal transgênico de diabetes (Db/Db) e mostrou diminuir a fosforilação da tau (Perry et al., 2003; Nakamura, et al., 2010). Além disso, o GLP-1 pode aumentar a proliferação, facilitar o reparo das redes neuronais do tecido cortical, podendo ter um efeito protetor em pacientes com DA (Greenberg e Jin, 2006; Kim et al., 2017).

Até o momento, poucos estudos mostram a relação do uso de liraglutida no tratamento da DA. Em animais APP/presenilina 1 (PS1) o tratamento com liraglutida (500 nmol/kg) durante 3 e 5 meses, diminuiu os níveis de β A (Hansen et al., 2016a). Outro resultado aponta que o tratamento por 2 semanas na dose de 25 ng/kg de Liraglutida, melhorou o dano cognitivo observado no teste do labirinto aquático de Morris, reconhecimento de objetos, além de diminuir a reatividade da micróglia e aumentar a neurogênese em animais APP/PS1 (McClellan et al., 2015). Poucos são os estudos que mostram os efeitos do tratamento com liraglutida em um modelo animal de DA. Também não há estudos que mostram os efeitos em pacientes com DA, e nem mesmo a diferença do tratamento entre os sexos.

1.7 Justificativa

A DA é uma doença grave para o paciente já que induz declínio cognitivo progressivo, prejuízo funcional e perda total da independência. As primeiras manifestações clínicas da DA incluem perda de memória a curto prazo e disfunção executiva correspondente a neurodegeneração em áreas cerebrais que medeiam estas funções. A DM2 é responsável por cerca de 90% de todos os casos de DM e é caracterizada por uma redução na capacidade da insulina de estimular a utilização de glicose (resistência à insulina) e inadequada secreção de insulina pelas células β pancreática em resposta à hiperglicemia (Correia, et al., 2012). Curiosamente, pacientes com DA e DM2 apresentam anormalidades semelhantes incluindo disfunção metabólica, estresse oxidativo e neuroinflamação (De Felice e Ferreira, 2014). Além disso, DM2 e DA também apresentam sinais e sintomas clínicos semelhantes, incluindo comprometimento cognitivo, glicemia de jejum alterada, a hiperglicemia crônica e atrofia hipocampal (Chen Z. e Zhong, 2013).

Muitos estudos estão sendo realizados para o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos, bem como, um tratamento adequado para DA. Todavia, nenhum fármaco é o ideal e por isso, torna-se essencial estudos na busca de novos alvos terapêuticos pré-clínicos para futuramente ser utilizados na clínica. Ainda assim, a similaridade entre as duas doenças, as diferenças comportamentais e fisiológicas em machos e fêmeas, foi o que impulsionou a pesquisa sobre os fármacos utilizados para DM2 no dano cognitivo e parâmetros inflamatórios, em um modelo animal de demência tipo DA e em um modelo animal de envelhecimento, em camundongos machos e fêmeas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito protetor da liraglutida sobre a memória e a neuroinflamação em modelo animal de demência do tipo DA induzido pela administração de βA_{1-42} .

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da liraglutida na memória espacial (tempo e erros) através do teste do labirinto octagonal, em um modelo animal de demência tipo DA induzido pela administração do peptídeo βA_{1-42} em camundongos black C57/BL6 com 3 ou 12 meses, machos ou fêmeas;
- Avaliar o efeito da liraglutida na memória espacial (número de entradas e alternância espontânea) através do teste do labirinto de Y, em um modelo animal de demência tipo DA induzido pela administração do peptídeo βA_{1-42} em camundongos black C57/BL6 com 3 ou 12 meses, machos ou fêmeas;
- Avaliar o efeito da liraglutida na memória de habituação através do teste do campo aberto, em um modelo animal de demência tipo DA induzido pela administração do peptídeo βA_{1-42} em camundongos black C57/BL6 com 3 ou 12 meses, machos ou fêmeas;
- Avaliar o efeito da liraglutida nos níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4 ou IL-10), em um modelo animal de demência tipo DA induzido pela administração do peptídeo βA_{1-42} em camundongos black C57/BL6 com 3 ou 12 meses, machos ou fêmeas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados no presente estudo camundongos Black C57/BL6 machos ou fêmeas com 3 meses ou 12 meses de idade quando iniciado o experimento, pesando 20-30 g procedentes do biotério da UNESC. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com alimento e água disponíveis, e alojados em gaiolas de plástico com maravalha. Todas as manipulações foram realizadas entre às 8h e às 16h. O comitê de ética local (Comissão de Ética para o uso de Animal - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense) aprovou este estudo sob o número de protocolo 079/2015-1 e 061/2017-1. Todos procedimentos experimentais foram executados dentro das diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Indução do modelo animal de demência tipo DA induzido pela administração de oligômeros βA_{1-42}

O peptídeo βA_{1-42} (Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi dissolvido numa solução de tampão fosfato (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5) na concentração de 1 $\mu g/\mu L$. A solução foi incubada durante 7 dias em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 para permitir a agregação dos peptídeos βA_{1-42} em oligômeros (Ueda et al., 1994; Resende et al., 2008; Ruiz-Muñoz et al., 2011; Garcez et al., 2017). Após a agregação, a solução foi armazenada a -20 °C até a sua utilização. No dia da administração a solução foi diluída na dose final de 100 pmol/ μL em líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) (NaCl 24 mM, KCl 2,5 mM, $MgSO_4$ 2,0 mM, KH_2PO_4 1,25 mM, 26 mM de $NaHCO_3$, glucose 10 mM e sacarose 4 mM). Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (1,5%) utilizando um aparelho de anestesia inalatória. Os oligômeros βA foram injetados através de uma agulha de aço inoxidável de calibre 28 com 3 mm de comprimento acoplada a uma seringa de Hamilton. A agulha foi inserida unilateralmente através da pele e do crânio diretamente no ventrículo lateral esquerdo, intracerebroventricular (i.c.v). A localização do bregma foi realizada pela visualização de um triângulo equilátero, traçando uma linha entre os olhos e a parte superior aos olhos do camundongo, e a partir desse ponto, foi medido 1mm posterior e 1mm para lateral esquerda, a agulha foi inserida nesse ponto a uma profundidade de 2,5mm (Laursen e Belknap, 1986;

Gomes et al., 2013). Os oligômeros βA foram injetados no volume de 4 μl (400 pmol/sítio) ao longo de um período de 10 segundos, seguido por um atraso de 10 segundos para permitir a total difusão da solução.

3.3 Tratamento e desenho experimental

A liraglutida (Victoza[®]) foi diluída em solução salina para administração via subcutânea (s.c) e até o momento não há na literatura uma dose definida de liraglutida, portanto, realizou-se uma curva de dose-resposta nas doses de 0,001 mg/kg, 0,01 mg/kg ou 0,1 mg/kg de peso corporal do animal, administradas uma vez por dia (10h00 da manhã), durante um período de 17 dias. O tratamento foi iniciado 24 horas após a administração intracerebroventricular i.c.v. dos oligômeros βA_{1-42} . Todo o experimento foi dividido em duas etapas: etapa 1 corresponde ao machos ou fêmeas com 3 meses de idade e a etapa 2 corresponde aos machos ou fêmeas com 12 meses de idade. Então, na etapa 1 (Figura 4), os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos experimentais. Os animais controle que recebem ACSF i.c.v. foram divididos em ACSF + salina; ACSF + liraglutida 0,001 mg/kg; ACSF + liraglutida 0,01 mg/kg e ACSF + liraglutida 0,1mg/kg. Para o modelo animal de demência do tipo DA, os animais que receberam os oligômeros βA_{1-42} i.c.v. foram divididos em βA_{1-42} + salina, βA_{1-42} + liraglutida 0,001 mg/kg, βA_{1-42} + liraglutida 0,01 mg/kg, βA_{1-42} + liraglutida 0,1 mg/kg. A etapa 1 corresponde aos mesmos grupos experimentais para machos ou fêmeas com 3 meses de idade, totalizando 10 animais por grupos (10x8 grupos experimentais machos = 80 e 10x80 grupos experimentais fêmeas = 80), totalizando 160 animais. Após o término dos testes comportamentais da Etapa 1, foi selecionada a melhor dose da curva dose-resposta de liraglutida para o tratamento na Etapa 2.

Portanto, na etapa 2 (Figura 5), foram utilizados animais com 12 meses de idade, machos ou fêmeas e divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: animais controle que receberam injeção i.c.v de ACSF e foram divididos em ACSF + salina e ACSF + liraglutida 0,01 mg/kg. Para o modelo animal de demência tipo DA, os animais receberam injeção i.c.v de βA_{1-42} e os animais foram divididos em βA_{1-42} + salina e βA_{1-42} + liraglutida 0,01 mg/kg. Portanto, a etapa 2 corresponde aos mesmos grupos experimentais de machos e fêmeas, todos com 12 meses de idade, utilizando 10 animais por grupo (10x4 grupos experimentais machos = 40 e 10x4 grupos experimentais fêmeas = 40), totalizando 80 animais.

3.3.1 Etapa 1

Nos animais machos ou fêmeas, que receberam injeção i.c.v de ACSF ou βA_{1-42} , após 24 horas foi iniciado o tratamento por 17 dias com a curva dose-resposta de liraglutida (0,001mg/kg, 0,01 mg/kg e 0,1 mg/kg). No 11° e 12° dia de tratamento foi realizado o teste de habituação ao campo aberto (treino e teste), no 13° dia foi realizado o teste do labirinto em Y e nos dias 14° ao 18° foi realizado o teste no labirinto octagonal, como demonstrado na figura 4. No 18° dia, 24 horas após o último tratamento com a curva dose-resposta de liraglutida, e após a realização do teste comportamental foi realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical. O hipocampo foi dissecado e colocado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para posteriores análises bioquímicas para avaliar os níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10).

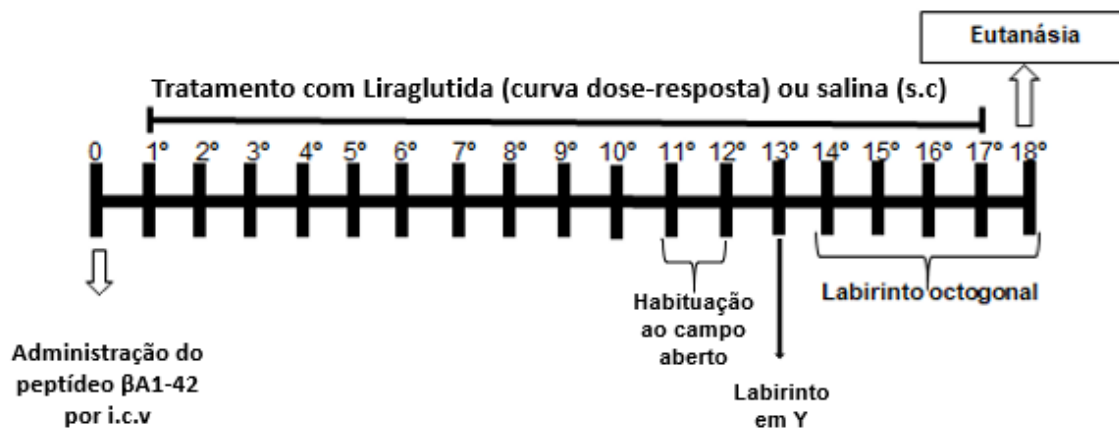


Figura 4: Linha do tempo do protocolo experimental da etapa 1. Fonte: Do autor.

3.3.2 Etapa 2

Nos animais machos ou fêmeas, 24h após a injeção i.c.v de ACSF ou de βA_{1-42} foi iniciado o tratamento por 17 dias com liraglutida (0,01mg/kg). No 11° e 12° dia de tratamento foi realizado o teste de habituação ao campo aberto (treino e teste), no 13° dia foi realizado o teste do labirinto em Y e do dia 14° ao 18° dia, foi realizado o teste no labirinto octagonal (figura 4). No 18° dia, 24 horas após o último tratamento com liraglutida, e após a realização do teste comportamental, foi realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical. O hipocampo foi dissecado e colocado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados à -80 °C para posteriores análises bioquímicas para avaliação dos níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10).

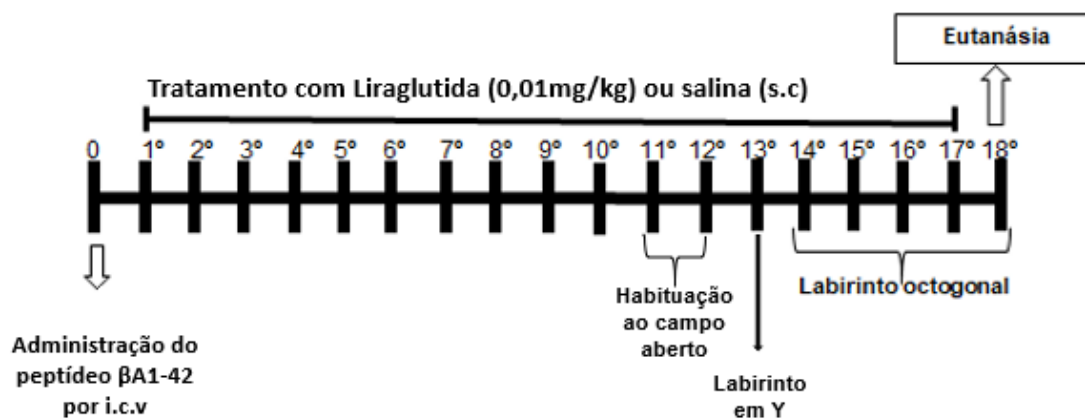


Figura 5: Linha do tempo do protocolo experimental da etapa 2. Fonte: Do autor.

3.4 Testes comportamentais

3.4.1 Campo aberto

No 11º dia, 24 horas após a última administração de liraglutida, os animais foram colocados na sala de comportamento para habituarem ao ambiente por 30 minutos, e após será iniciado o treino no aparato de habituação ao campo aberto, o qual avalia memória de habituação. Os camundongos foram submetidos ao teste de habituação ao campo aberto e logo após o teste, os animais retornaram ao biotério. No 12º dia os camundongos foram submetidos ao teste habituação ao campo aberto e logo após o teste, os camundongos retornam ao biotério. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória (*crossing*). A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras (*rearing*) é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade. O equipamento consiste em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repetiu o procedimento do treino. Os números de cruzamentos (*crossing*) através das linhas pretas e a atividade exploratória (*rearing*) foram avaliados em ambas as sessões. (Vianna et al., 2000).

3.4.2 Labirinto em Y

Esse teste é realizado para avaliar a memória de reconhecimento espacial dos animais. O aparelho é feito de MDF preto e possui três braços iguais (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120°. Este foi colocado em uma sala escura com iluminação de lâmpada vermelha, para deixar os animais mais confortáveis para explorar (Deacon e Rawlins, 2006) e com dicas visuais nas paredes do braço para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consiste de duas sessões separadas por um intervalo de 2 horas realizado no 13º dia

de tratamento com liraglutida, 24 horas após a última administração. Na primeira sessão, o animal foi colocado no final de um dos braços, chamado de braço A, e teve livre acesso para explorar o braço B durante 5 min. Nesta sessão inicial, o terceiro braço ou braço C do labirinto estava bloqueado por uma porta guilhotina. Após os 5 minutos os animais retornaram a caixa moradia. Depois de 2 horas, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no braço A do labirinto para explorar livremente os três braços durante 5 min. O número total de entradas em cada braço foi avaliado, e a alternância espontânea também foi registrado. A alternância espontânea foi calculada como o número total de alternâncias nos três braços, dividido pelo número correto de alternância nos três braços, multiplicado por 100. As alternâncias corretas foram consideradas como ABC, CBA, BAC, BCA (Fu et al., 2017).

3.4.3 Labirinto octagonal

O aparato do labirinto octogonal consiste em 8 braços, numerados de 1 a 8 (48×12 cm), que se estende radialmente a partir de uma área central (32 cm de diâmetro). O aparelho é colocado a 50 cm acima do chão, e possui formas geométricas posicionadas na reta do braço o qual é colocada a recompensa. Esse teste é usado para avaliar a memória espacial. No primeiro dia, os camundongos foram colocados um de cada vez no aparato para explorar livremente durante 5 minutos, sem recompensa, apenas para se habituarem ao equipamento. Após, retornaram a caixa moradia e foram devolvidos ao biotério com um cereal de chocolate (Nescau Cereal®) por animal em cada caixa moradia, para se habituarem a comida (recompensa), juntamente com a ração padrão do biotério, porém essa foi racionada (2g por animal para machos e 1,5g por animal para as fêmeas) para que no dia seguinte (primeiro dia de teste) os animais estivessem com fome para facilitar a realização da tarefa. No primeiro dia de teste, 14º dia de tratamento com liraglutida, o animal foi colocado novamente no aparato e quatro dos oito braços do labirinto possuíam a recompensa (cereal), e nestes mesmos braços as pistas geométricas. Cada animal teve 10 minutos para realizar a tarefa de encontrar a recompensa nos 4 braços, quando o animal encontrou as 4 recompensas ou passados os 10 minutos, eles foram devolvidos à caixa moradia, onde novamente foi realizado o racionamento de comida e eles foram devolvidos ao biotério. Esse procedimento foi realizado da mesma forma nos 3 dias subsequentes, totalizando 4 dias de teste com intervalos de 24 horas. Os parâmetros avaliados foram: tempo total para encontrar a recompensa nos 4 braços e erros totais (nº de entradas) em cada braço para encontrar a recompensa (Foyet et al., 2011; Hritcu et al., 2012). Uma hora após a finalização do teste os animais foram submetidos a eutanásia como descrito anteriormente.

3.5 Análises Imunoquímicas por ensaio enzimático

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

3.6 Análises Estatísticas

Os resultados da etapa 1, foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuíam uma distribuição normal. Os resultados do teste de labirinto octogonal foram analisados por análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*repeated measures via two-way ANOVA*), seguido do teste de *post hoc* de *Duncan* quando o $p < 0,05$. Os dados do Labirinto em Y foram analisados por ANOVA de duas vias, o teste do campo aberto foi analisado por teste t de *Student* pareado, considerando o $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Os dados dos testes citados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados de imunoensaio enzimático foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de *Duncan* quando o $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados de machos e fêmeas foram analisados individualmente.

Já os resultados da etapa 2 também foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuíam uma distribuição normal. Os resultados do teste de labirinto octogonal foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do teste de *post hoc* de *Duncan* quando o $p < 0,05$. Os dados do Labirinto em Y foram analisados por ANOVA de uma via, o teste do campo aberto foi analisado por teste t de *Student* pareado, considerando o $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Os dados dos testes citados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados de imunoenensaio enzimático foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Duncan* quando o $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados de machos e fêmeas foram analisados individualmente.

4. RESULTADOS

Os resultados descrito abaixo são referentes a etapa 1 do estudo. Os resultados do labirinto octogonal foram analisados por análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*ANOVA de medidas repetidas*), utilizando como fatores o modelo e o tratamento tanto para machos quanto para as fêmeas da etapa 1. Nos machos os dados apresentaram diferença significativa no teste de ANOVA quando observado a latência para encontrar a recompensa (R1 modelo* tratamento $F(2,049) = p < 0,03$), erros totais para encontrar a recompensa [R1 modelo*tratamento $F(2,28) = p < 0,019$]. Na latência para encontrar a recompensa (Figura 6A), os animais controles que receberam ACSF e tratamento com salina, tiveram um melhor desempenho no tempo para encontrar a recompensa, visto que houve diferença no 3° dia ($p < 0,040$) e no 4° dia ($p < 0,000$), comparados ao primeiro dia de teste. O mesmo aconteceu no grupo ACSF + 0,001mg de Liraglutida, onde ocorreu um melhor desempenho no tempo para encontrar a recompensa, visto que houve diferença no 3° dia ($p < 0,011$) e no 4° dia ($p < 0,0001$), comparados ao primeiro dia de teste. Já os grupos ACSF + 0,01mg e 0,1mg de Liraglutida, tiveram uma melhora apenas no último dia de teste quando comparado ao primeiro dia de teste ($p < 0,0001$ para ambas as doses). Os animais que receberam $O\beta A_{1-42}$ e tratados com salina, tiveram um comprometimento cognitivo, visto que apenas tiveram uma melhora no último dia de teste, comparado ao seu primeiro dia de teste ($p < 0,01$). Já os animais tratados com 0,001mg Liraglutida, houve uma melhora no 3° ($p < 0,0001$) e 4° ($p < 0,0001$) quando comparado ao primeiro dia de teste. O mesmo ocorreu com os animais tratados na dose 0,01mg de Liraglutida (3° $p < 0,0001$; 4° $p < 0,0001$). A figura 6B mostra os erros totais para encontrar a recompensa. Os animais que receberam ACSF + salina, houve uma diminuição nos erros totais para encontrar a recompensa no 3° ($p < 0,0001$) e 4° ($p < 0,0001$) dia, quando comparado ao 1° dia do teste. O mesmo também foi observado nos animais ACSF tratados com 0,001mg de Liraglutida, diminuíram os erros para encontrar a recompensa no 3° ($p < 0,0001$) e 4° ($p < 0,0001$). Já os animais ACSF tratados com 0,01mg de Liraglutida, tiveram uma melhora na diminuição dos erros somente no 4° do teste ($p < 0,01$), comparado ao primeiro dia do teste. Porém os animais ACSF tratados com 0,1mg de Liraglutida, houve uma melhora nos erros totais no 2° ($p < 0,0001$), 3° ($p < 0,0001$) e 4° ($p < 0,0001$) dias de teste, tendo uma evolução melhor que os animais ACSF + salina. Os animais que receberam $O\beta A_{1-42}$ + salina tiveram uma diminuição nos erros totais somente no 4° dia ($p < 0,002$), aprendendo a tarefa apenas no último dia. Os animais $O\beta A_{1-42}$ tratados com 0,001mg de Liraglutida, evoluíram ao longo do teste, diminuindo os erros no 2° ($p < 0,03$), 3° ($p < 0,02$) e 4° ($p < 0,006$). Os animais machos que receberam $O\beta A_{1-42}$

42 e tratados com 0,01mg de liraglutida, diminuíram os erros no 3° (<p0,0001) e 4° (p<0,0001) dia, quando comparado ao primeiro dia de teste. O mesmo ocorreu com os animais O β A₁₋₄₂ tratados com 0,1mg de liraglutida, 3° (p<0,002) e 4° (p<0,03). Portanto, os animais que receberam injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂ tiveram dano na memória espacial, pois levaram mais tempo e cometeram mais erros para encontrar a comida. Já as doses 0,001mg e 0,1mg de liraglutida melhoraram a memória espacial, observado no tempo e nos erros totais para encontrar a recompensa.

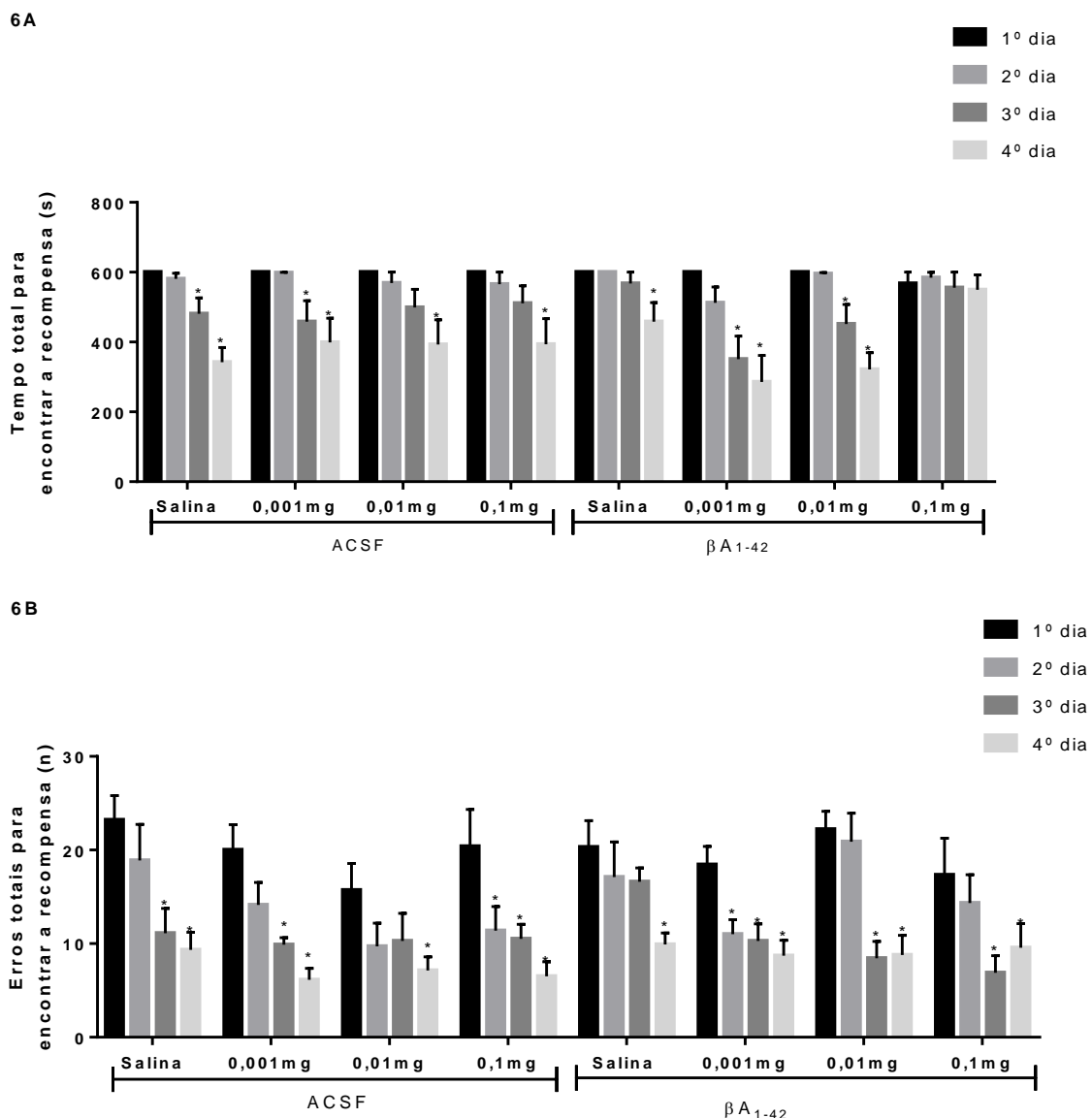


Figura 6: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste do labirinto octagonal em camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 6A mostra a latência em segundos para encontrar a recompensa nos 4 braços. 6B mostra os erros totais de entrada nos braços antes de encontrar a recompensa nos 4 braços. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo, *p<0,05 quando comparado ao primeiro dia de teste de cada grupo.

Os dados mostram resultados do teste ao campo aberto (Figura 7) nos machos referente a etapa 1. O test t para amostras dependentes mostraram que os animais que receberam ACSF + salina tiveram uma diferença entre treino e teste nos cruzamentos (Figura 7A) ($F(1,9) = 5,01$; $p = 0,000$). Assim como os animais ACSF tratados com 0,01mg de Liraglutida ($F(1,9) = 4,59$; $p = 0,0001$), 0,1mg ($F(1,9) = 2,36$; $p = 0,045$) e 0,001mg ($F(1,8) = 0,78$; $p = 0,046$) tiveram diferença entre treino e teste no numero de cruzamentos, melhorando a memória de habituação. Analisando os animais que receberam injeção i.c.v de $O\beta A_{1-42}$ e tratados com liraglutida tiveram diferença entre treino e teste, mostrando que não tiveram dano na memória de habituação observado pelo número de cruzamentos, $\beta A_{1-42} + 0,001mg$ ($F(1,9) = 2,79$; $p=0,02$), $\beta A_{1-42} + 0,01mg$ ($F(1,9) = 4,35$; $p = 0,0001$), $\beta A_{1-42} + 0,1mg$ ($F(1,9) = 4,76$; $p = 0,0001$). Apenas o grupo $O\beta A_{1-42}$ tratado com salina não apresentou diferença entre o número de cruzamento, mostrando dano na memória de habituação ($O\beta A_{1-42} + salina$ ($F(1,9) = 2,97$; $p = 0,104$). Para o número de levantamentos, pode-se observar que apenas os animais machos que receberam injeção i.c.v de ACSF e tratados com salina tiveram uma diferença no número de levantamentos entre o treino e o teste ($F(1,9) = 5,62$; $p = 0,0001$). Assim como os animais do controle ACSF tratados com liraglutida nas doses 0,01mg e 0,1mg melhoraram a memória de habituação, observado pelo número de cruzamentos (ACSF + 0,01mg ($F(1,9) = 2,16$; $p=0,011$), ACSF + 0,1mg ($F(1,9) = 2,00$; $p=0,004$). Os animais do controle ACSF tratados com 0,001mg de Liraglutida não tiveram diferença entre o treino e o teste no número de levantamentos, mostrando dano na memória de habituação (ACSF + 0,001 ($F(1,9) = 1,79$; $p=0,11$)). Os animais que receberam administração i.c.v de $O\beta A_{1-42}$, e tratados com salina e 0,001mg de Liraglutida, não tiveram diferença nas sessões de treino e teste, apresentando um dano na memória de habituação observado pelo número de levantamentos. $O\beta A_{1-42} + salina$ ($F(1,9) = 0,20$; $p=0,842$), $O\beta A_{1-42} + 0,001mg$ de Liraglutida ($F(1,9) = 0,87$; $p=0,40$). Os animais tratados com 0,01mg e 0,1mg de Liraglutida, apresentaram diferença nas sessões treino e teste, melhorando a memória de habituação ($O\beta A_{1-42} + 0,01mg$ ($F(1,9) = 3,42$; $p=0,007$)), $O\beta A_{1-42} + 0,1mg$ ($F(1,9) = 2,30$; $p=0,040$)). De maneira geral, os animais que receberam injeção de $O\beta A_{1-42}$, apresentaram dano na memória de habituação, e quando tratados com 0,01mg e 0,1mg de liraglutida, houve uma reversão desse dano.

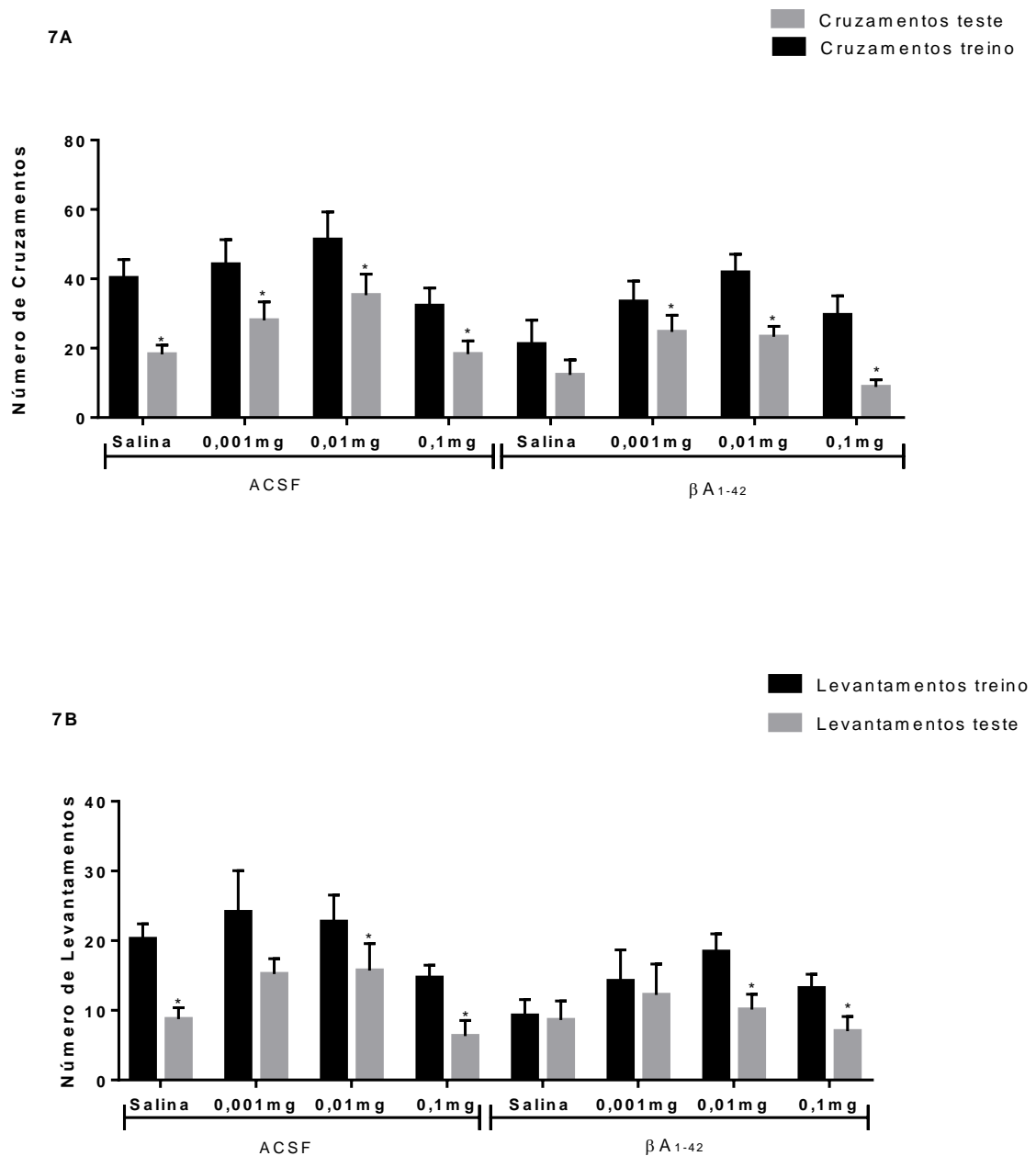


Figura 7: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste de habituação ao campo aberto em camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 7A mostra o número de cruzamentos entre treino e teste. A figura 7B mostra o número de levantamentos entre treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao treino do mesmo grupo.

Os gráficos a seguir demonstram os resultados do labirinto em Y (Figura 8) dos machos da etapa 1. Anova de duas vias mostrou interação entre modelo e tratamento ($p < 0,03$) e que os animais que receberam injeção i.c.v de $O\beta A_{1-42}$ tratados com salina ($p < 0,008$) e com a dose 0,1mg de Liraglutida ($p < 0,006$), tiveram uma diminuição no número de entradas em comparação com o grupo ACSF tratados com salina, mostrando que tiveram um dano cognitivo na atividade exploratória no labirinto em Y (Figura 8A), e houve um aumento no número de entradas nos animais $O\beta A_{1-42}$ tratados com 0,001mg e 0,01g de liraglutida, melhorando a memória espacial em comparação ao $O\beta A_{1-42}$ + salina ($O\beta A_{1-42}$ + 0,01mg $p < 0,035$ / $O\beta A_{1-42}$ + 0,001 $p < 0,013$). Já na figura 8B, mostra a alternância espontânea no labirinto em Y. A anova de duas vias não mostrou interação entre modelo e tratamento ($p < 0,63$). A alternância espontânea avalia memória de espacial, entretanto não foi observado diferenças entre os grupos.

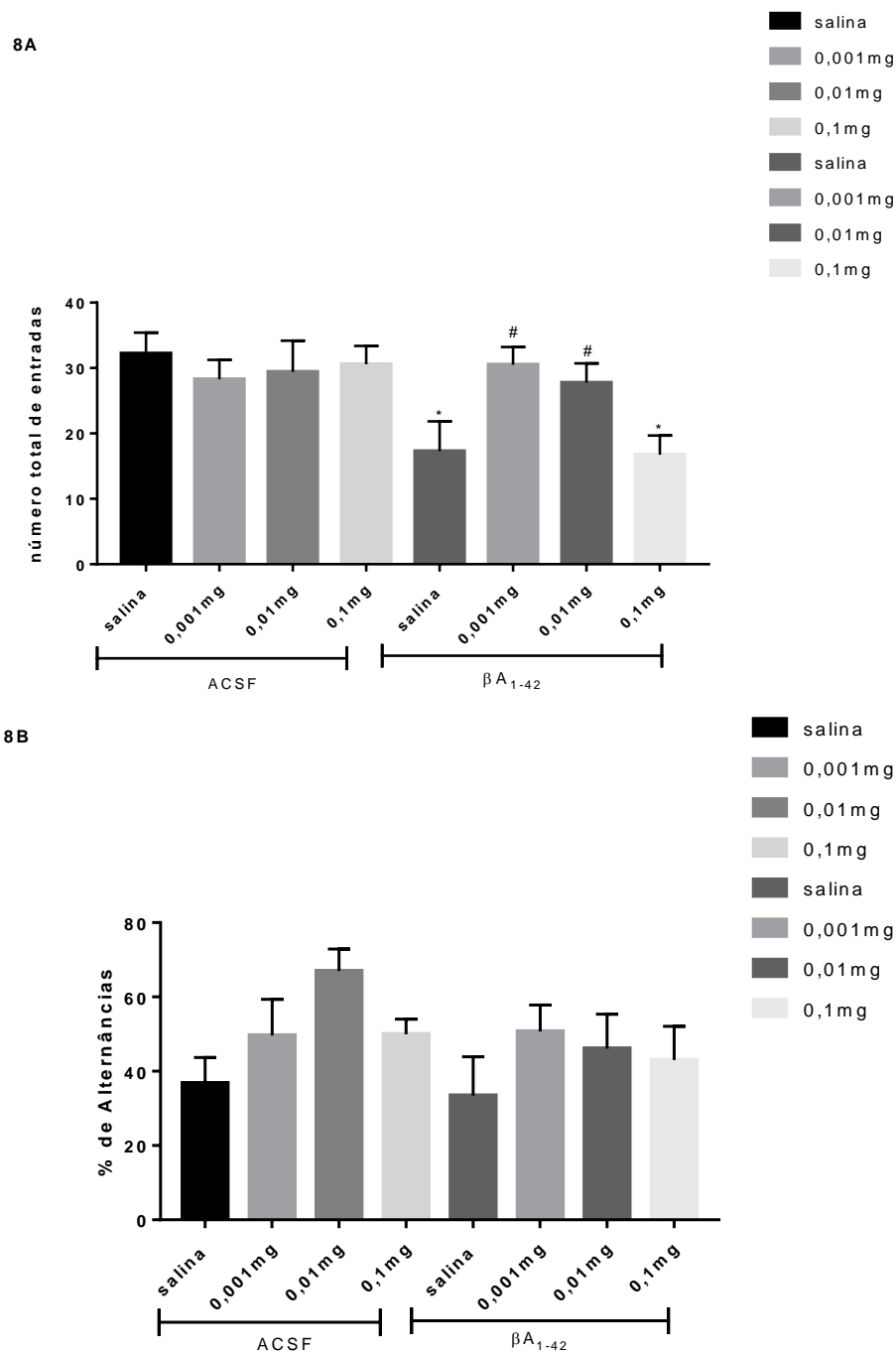


Figura 8: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste de Labirinto em Y em camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 8A mostra o número de entradas nos braços do labirinto. A figura 8B mostra a porcentagem de alternâncias. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. *p<0,05 quando comparado ao ACSF + salina. #p<0,05 quando comparado ao βA_{1-42} + salina.

A figura 9, mostra os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10), nos machos da etapa 1. A anova de duas vias mostrou interação entre modelo e tratamento apenas nos níveis de TNF- α ($p < 0,003$). O grupo ACSF tratado com 0,01mg de liraglutida aumentou os níveis de TNF- α em comparação ao controle ($p < 0,02$). Já o grupo que recebeu injeção i.c.v de βA_{1-42} aumentou os níveis de TNF- α ($p < 0,015$) em relação ao controle ACSF + salina. Porém nos grupos βA_{1-42} que receberam tratamento com 0,001mg e 0,01mg de liraglutida diminuíram esse aumento causado pelos βA_{1-42} ($p < 0,047$ e $p < 0,049$, respectivamente).

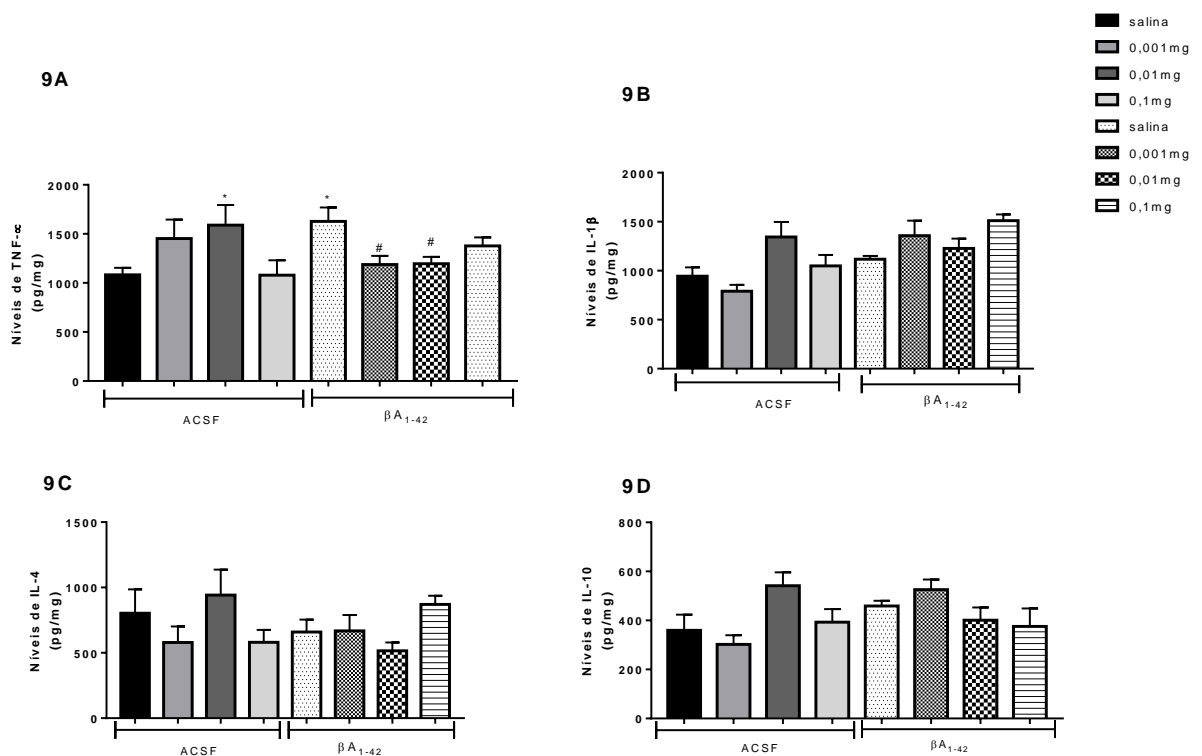


Figura 9: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 em hipocampo de camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 9A mostra os níveis de TNF- α . A figura 9B mostra os níveis de IL-1 β . A figura 9C mostra os níveis de IL-4. A figura 9D mostra os níveis de IL-10. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao ACSF + salina, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo βA_{1-42} .

Os dados a seguir mostram os resultados comportamentais e níveis de citocinas da etapa 1 das fêmeas. A figura 10 mostra os resultados do labirinto octagonal. A anova de medida repetidas mostrou interação entre modelo e tratamento ($F(3,22)$; $p < 0,001$) no tempo para encontrar a recompensa e nos erros totais para encontrar a recompensa (modelo*tratamento $F(2,00)$; $p < 0,042$). Pode-se observar como demonstrado na figura 10A que os grupos que receberam ACSF tratados com salina, 0,001mg e 0,01mg de Liraglutida tiveram um melhor desempenho no tempo para encontrar a recompensa durante o teste no 3° dia ($p < 0,0001$; $p < 0,002$; $p < 0,0001$, respectivamente) e no 4° dia, em comparação ao primeiro dia de teste ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,037$, respectivamente), evoluindo ao longo do teste. O grupo ACSF + 0,1mg apenas foi significativo no 3° dia ($p < 0,031$). Já os animais que receberam injeção i.c.v de $O\beta A_{1-42}$, tratados com salina não houve evolução ao longo do teste, mostrando que esses animais apresentaram dano cognitivo no tempo para encontrar a recompensa (2° $p < 1,00$; 3° $p < 0,378$; 4° $p < 0,125$). O mesmo aconteceu nos animais do grupo $O\beta A_{1-42}$ tratados com 0,001mg de Liraglutida (2° dia $p < 1,00$; 3° dia $p < 1,000$; 4° dia $p < 0,108$). Já os animais que receberam 0,01mg de Liraglutida tiveram um melhor desempenho no 3° e 4° dia em comparação ao primeiro dia, melhorando o dano cognitivo causado pelo $O\beta A$ (3° dia $p < 0,0001$; 4° dia $p < 0,0001$). Os animais que receberam o tratamento com 0,1mg e Liraglutida tiveram uma melhora no tempo apenas no 4° dia ($p < 0,002$). A figura 10B mostra os erros totais para encontrar a recompensa das fêmeas da etapa 1. Verificando os resultados do controle, percebe-se que os animais que receberam injeção ACSF i.c.v tratados com salina, tiveram uma evolução ao longo do teste, mostrando diferenças no 2°, 3° e 4° dia de teste, não sendo observado dano cognitivo (2° $p < 0,0001$; 3° $p < 0,0001$; 4° $p < 0,0001$). As fêmeas tratadas com 0,001mg de Liraglutida diminuíram os erros no 3° e 4° dia de teste (3° $p < 0,045$; 4° $p < 0,0001$). Mas os animais do controle que foram tratados com 0,01mg Liraglutida diminuíram os erros totais no 2°, 3° e 4° dia, melhorando o desempenho nesse teste, (2° dia $p < 0,0001$; 3° $p < 0,0001$; 4° $p < 0,0001$). A mesma melhora também foi observada nos animais ACSF tratados com 0,1 mg de v Liraglutida (2° $p < 0,03$; 3° $p < 0,0001$; 4° $p < 0,0001$). Quando foi administrado $O\beta A_{1-42}$ para indução do modelo de demência tipo DA, foi verificado que os animais fêmeas do grupo $O\beta A_{1-42}$ + salina, tiveram uma diferença no 2°, 3° e 4°, porém desde o primeiro dia de teste cometeram mais erros que o grupos ACSF + salina ($O\beta A_{1-42}$ + salina 2° dia $p < 0,00$; 3° $p < 0,0001$; 4° $p < 0,0001$). Quando os animais foram tratados com 0,001mg de Liraglutida houve uma melhora nos erros 3° e 4° dia (3° dia $p < 0,049$; 4° $p < 0,035$). Porém os animais que foram tratados na dose 0,01mg cometeram menos erros no 2°, 3° e 4° dia de teste, mostrando uma evolução pois diminuíram os erros ao longo dos dias 2° dia $p < 0,01$; 3° $p < 0,046$; 4° $p < 0,004$). A mesma

evolução também foi observada nos animais tratados com 0,1mg de liraglutida (2° dia $p < 0,02$; 3° dia $p < 0,00$; 4° dia $p < 0,010$). Foi observado então, que os animais que receberam injeção i.c.v de OBA1-42 tiveram um dano na memória espacial, no tempo para encontrar a comida, e quando tratados com 0,01mg e 0,1mg houve uma melhora cognitiva. Nos erros totais o grupo O β A₁₋₄₂ cometeu mais erros para encontrar a comida, apresentando na memória espacial, e quando tratados com 0,01 e 0,1mg houve uma melhora nos erros totais, revertendo o dano causado por O β A₁₋₄₂.

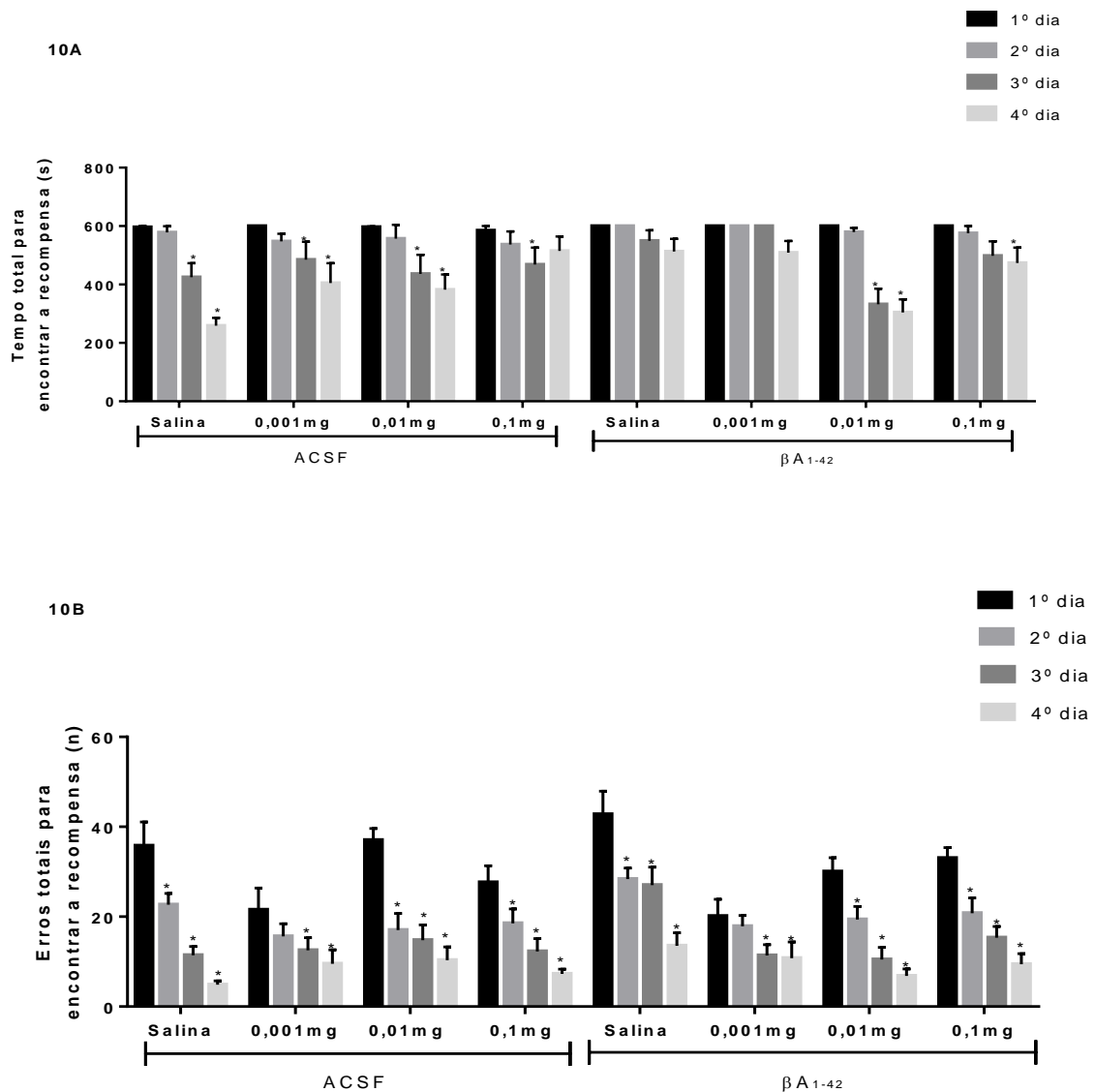
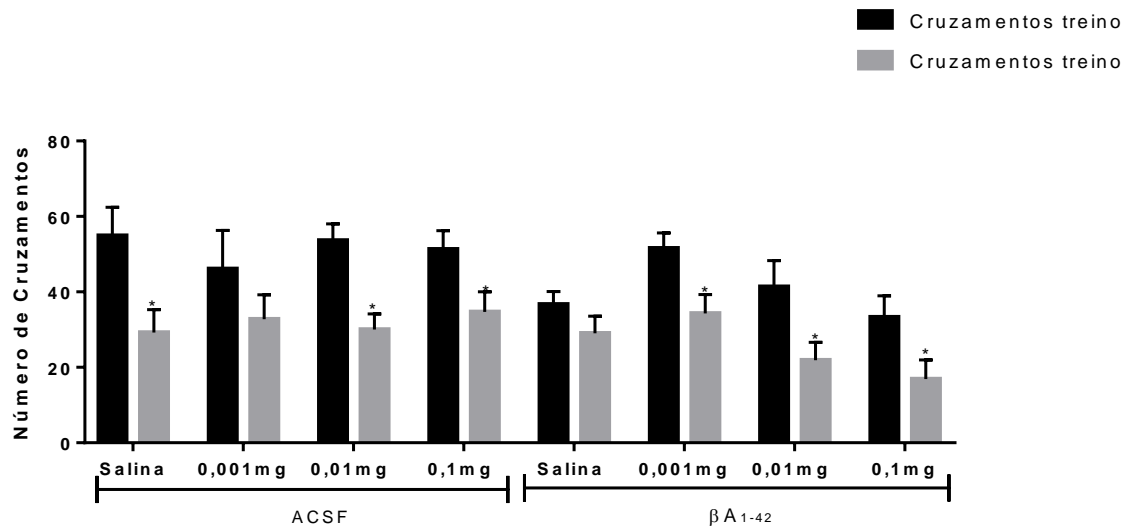


Figura 10: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste do labirinto octagonal em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com β A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 10A mostra a latência em segundos para encontrar a recompensa nos 4 braços. Figura 10B mostra os erros totais de entrada nos braços antes de encontrar a recompensa nos 4 braços. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao primeiro dia de teste de cada grupo.

Os dados abaixo mostram os resultados obtidos no campo aberto da etapa 1 das fêmeas. O teste t para amostras dependentes mostram que os animais do controle ACSF + salina, tiveram uma diferença entre o treino e teste no número de cruzamentos ($[F(1,9) = 3,47; p = 0,006]$). Os animais ACSF tratados com 0,001mg de liraglutida não houve diferença no número de cruzamentos entre treino e teste ($[F(1,9) = 1,7; p = 0,13]$) figura 11A. Já os animais ACSF tratados com 0,01mg e 0,1mg tiveram uma diferença no número de cruzamentos nas sessões treino e teste, melhorando a memória de habituação ($[F(1,9) = 4,81; p = 0,0001]$ / $[F(1,9) = 1,45; p = 0,046]$,). No entanto, os animais que receberam administração i.c.v de $O\beta A_{1-42}$ e o grupo peptídeo não houve diferença nos números de cruzamentos ($[F(1,9) = 2,79; p = 0,059]$). Quando os animais foram tratados na dose 0,001mg houve uma diferença entre treino e teste no número de cruzamentos ($F[(1,9) = 5,44; p = 0,00]$). O mesmo foi encontrado nas doses 0,01mg e 0,1mg nos cruzamentos (0,01mg $F[(1,9) = 3,27; p = 0,0001]$ / 0,1 $F[(1,9) = 5,26; p = 0,0001]$). A figura 11B mostra os números de levantamentos no campo aberto de todos os grupos da etapa 1 das fêmeas. Foi possível averiguar que os animais controle que receberam injeção i.c.v de ACFS e tratados com salina, tiveram uma diferença nas sessões treino e teste no número de levantamentos ($F[(1,9) = 3,70; p = 0,004]$). Os animais controle ACFS tratados com 0,001mg, 0,01 e 0,1mg não houve diferença no treino e testes (ACFS + 0,001mg $F[(1,9) = 1,39; p = 0,20]$ / ACFS + 0,01mg $F[(1,9) = 1,68; p = 0,13]$ / ACFS + 0,1mg $F[(1,9) = 0,90; p = 0,38]$). As doses 0,001mg e 0,01mg de Liraglutida causaram dano de memória de habituação, visto que não houve diferenças significativas no número de cruzamentos e levantamentos. Os animais que receberam injeção i.c.v de $O\beta A_{1-42}$, tratados com salina e com 0,001mg não houve diferenças nas sessões de treino e teste no número de levantamentos ($O\beta A_{1-42}$ + salina $F[(1,9) = 1,26; p = 0,23]$ / $O\beta A_{1-42}$ + 0,001mg $F[(1,9) = 1,91; p = 0,08]$). Porém quando os animais foram tratados com 0,01mg e 0,1mg houve diferença entre treino e teste nos levantamentos ($O\beta A_{1-42}$ + 0,01mg $F[(1,9) = 3,98; p = 0,00]$ / $O\beta A_{1-42}$ 0,1mg $F[(1,9) = 2,32; p = 0,035]$). De maneira geral, as doses 0,01mg e 0,1mg conseguiram prevenir o dano cognitivo causado pelos $O\beta A_{1-42}$ tanto no número de cruzamentos quanto no número de levantamentos, conseguindo melhorar a memória de habituação.

11A



11B

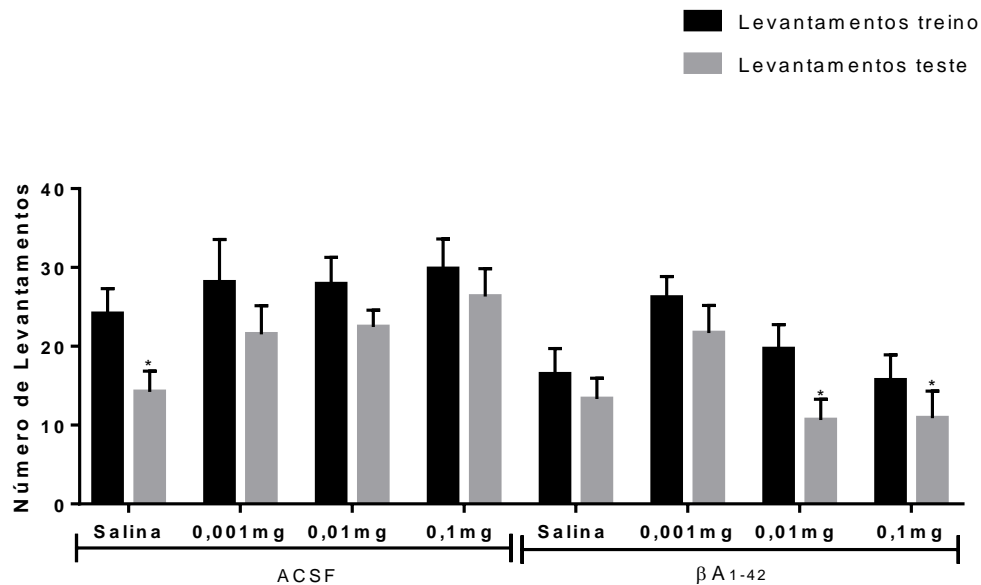
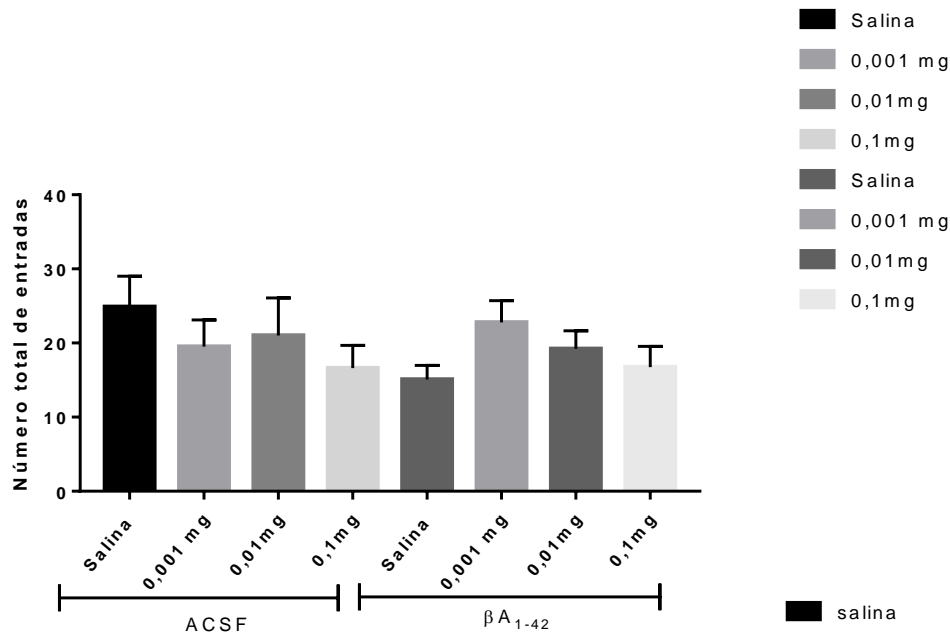


Figura 11: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste de Habituação ao campo aberto em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 11A mostra o número de cruzamentos entre treino e teste. A figura 11B mostra o número de levantamentos entre treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10-12 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao treino do mesmo grupo.

A figura 12, mostra os dados do labirinto em Y da etapa 1 fêmeas. A figura 12A mostra o número de entradas nos braços do Y, e pela anova de duas vias não houve diferenças entre os grupos, não houve interação com modelo e tratamento ($Df= 3; F(1,45) = p 0,23$). Não houve diferença na atividade exploratória dos animais. A figura 12B, mostra a alternância espontânea nos braços do Y. A anova de duas vias mostrou interação entre modelo e tratamento ($Df=3; F(3,20) ; p=0,027$), porém o unico grupo que foi diferente do controle ACSF + salina, foi o grupo ACSF tratado com 0,001mg de Liraglutida ($p<0,001$), mostrando que esse grupo teve memória espacial comprometida. De modo geral, os $O\beta A_{1-42}$, não causaram dano na memória espacial observado pelo labirinto em Y.

12A



12B

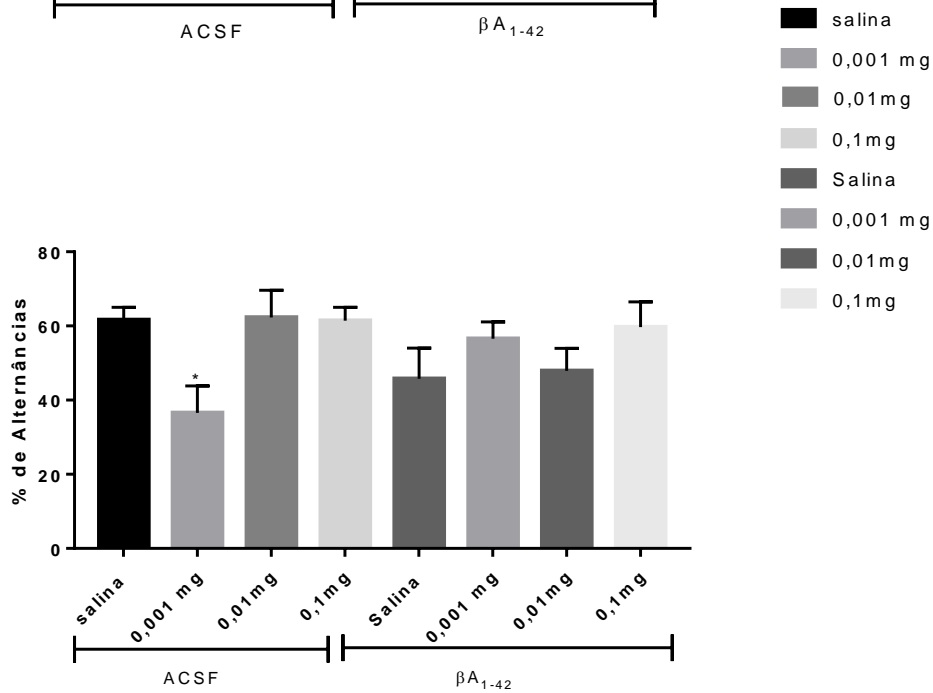


Figura 12: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) no teste de Labirinto em Y em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 12A mostra o número de entradas nos braços do labirinto. A figura 12B mostra a porcentagem de alternância. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao ACSF + salina.

A figura 13 demonstra os níveis de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10) no hipocampo das fêmeas da etapa 1. A figura 13A mostra os níveis de TNF- α , e a anova duas vias mostrou interação entre modelo e tratamento (Df(3); F[(3,88); p= 0,015). Os resultados evidenciam aumento de TNF- α que todos os grupos que receberam administração i.c.v de O β A₁₋₄₂ em comparação ao grupo ACSF + salina. (O β A₁₋₄₂+salina p<0,02 / O β A₁₋₄₂ + 0,001mg p<0,002 / O β A₁₋₄₂ + 0,01mg p<0,000 / O β A₁₋₄₂ + 0,1mg p<0,000). No entanto os animais do grupo O β A₁₋₄₂ que receberam tratamento com liraglutida 0,01mg, aumentaram os níveis de TNF- α em relação ao grupo O β A₁₋₄₂+ salina (p<0,004). A figura 13B mostra os resultados obtidos dos níveis de IL-1 β e pela anova de duas vias teve interação entre modelo e tratamento (Df(3); F[(3,88); = p 0,0015) e foi verificado que os animais do grupo O β A tratados com salina, 0,001mg e 0,01mg de liraglutida aumentaram os níveis de IL-1 β no hipocampo em comparação ao grupo ACSF+salina (O β A₁₋₄₂+salina p<0,02 / O β A₁₋₄₂ + 0,001mg p<0,002 / O β A₁₋₄₂ + 0,01mg p<0,000). Ainda assim, os animais PBA que tratados com 0,01mg de Liraglutida, tiveram os níveis de IL-1 β aumentados em relação ao grupo O β A+salina (p<0,004). Foi possível observar que a dose 0,01mg de liraglutida aumento os níveis de TNF- α quanto de IL-1 β , após a indução do modelo animal de demência tipo DA. A figura 13C mostra os níveis de IL-4 no hipocampo, e a anova de duas vias mostrou interação entre modelo e tratamento (Df(3); F[(7,75); p = 0,000). Os resultados apontam que os animais que receberam injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂ tratados com salina e 0,001mg de liraglutida, aumentaram os níveis de IL-4 (O β A₁₋₄₂+salina p<0,006 / O β A₁₋₄₂ + 0,001mg p<0,022). Já os grupos O β A₁₋₄₂ tratados com 0,01mg e 0,1mg diminuiram os níveis de IL-4, quando comparados ao grupo O β A₁₋₄₂ + salina (O β A₁₋₄₂ + 0,01mg p<0,03 / O β A₁₋₄₂ +0,1mg p<0,015). A figura 13D exibe os resultados encontrados nos níveis de IL-10. Como pode-se observar, os animais que receberam injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂ tratados com salina e 0,001mg de liraglutida, aumentaram os níveis de IL-10 (O β A₁₋₄₂+ salina p<0,000 / O β A₁₋₄₂ + 0,001mg p< 0,024). Porém os animais que receberam injeção O β A₁₋₄₂ e tratados com 0,01mg e 0,1mg de liraglutida, diminuiram o aumento de IL-10 em relação ao grupo O β A₁₋₄₂ + salina (O β A₁₋₄₂+0,01mg p< 0,02 / O β A₁₋₄₂ + 0,1mg p< 0,002). Portanto, o tratamento com liraglutida nas doses 0,01mg e 0,1mg conseguiram diminuir o aumento de IL-4 e IL-10 causado por O β A₁₋₄₂.

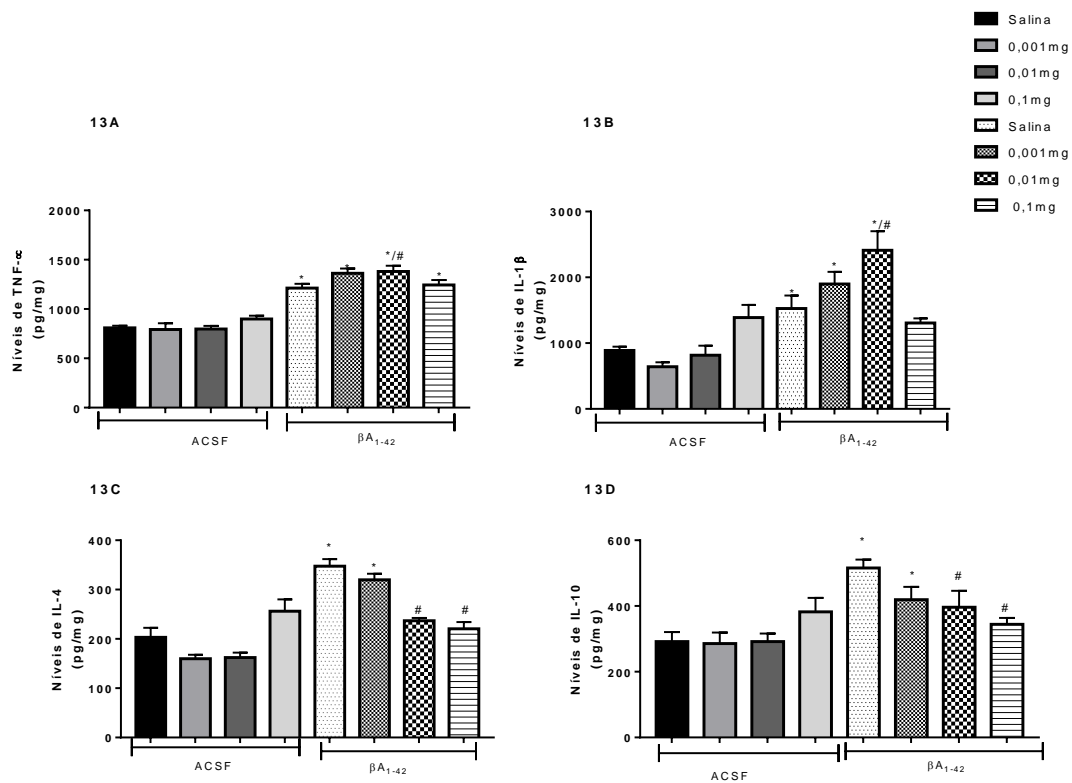


Figura 13: Efeito do tratamento curva dose-resposta de Liraglutida (0,001mg, 0,01mg e 0,1mg) nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 em hipocampo de camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 13A mostra os níveis de TNF- α . A figura 13B mostra os níveis de IL-1 β . A figura 13C mostra os níveis de IL-4. A figura 13D mostra os níveis de IL-10. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao ACSF + salina, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo βA_{1-42} .

A partir de então, os dados a seguir demonstram os resultados da etapa 2 do estudo, machos e fêmeas com 12 meses de idade. A figura 14 mostra os dados do labirinto octagonal nos machos, a anova de uma via mostra interação ($p < 0,045$) apenas no 4^o dia do teste. Os grupos ACSF+salina e O βA_{1-42} +salina, não tiveram diferenças significativas em nenhum dos dias dos testes, mostrando que tanto o processo de envelhecimento quanto o modelo animal tipo DA, tiveram dano cognitivo (1^o dia $p = 0,20$ / 2^o dia $p = 0,051$ / 3^o dia $p = 0,17$ / 4^o dia $p = 0,045$). Pode-se observar que no tempo total para encontrar recompensa (Figura 14A) houve apenas uma melhora no 4^o dia de teste quando os animais foram tratados com 0,01mg de Liraglutida, tanto nos animais ACSF+0,01mg ($p < 0,02$) e O βA_{1-42} +0,01mg ($p < 0,040$), quando comparados ao grupo O βA_{1-42} +salina. No entanto a figura 14B, mostra os erros totais para encontrar a recompensa ao longo do teste, e pela anova de 1 via não houve interação (1^o dia $p = 0,89$ / 2^o dia $p = 0,37$ / 3^o dia $p = 0,83$ / 4^o dia $p = 0,40$). Foi possível observar que tanto o grupo ACSF + salina e O βA_{1-42} + salina apresentaram dano na memória espacial. Porém os animais que

receberam $O\beta A_{1-42}$ e ACSF tratados com 0,01mg tiveram uma melhora cognitiva no tempo total, melhorando a memória espacial desses animais.

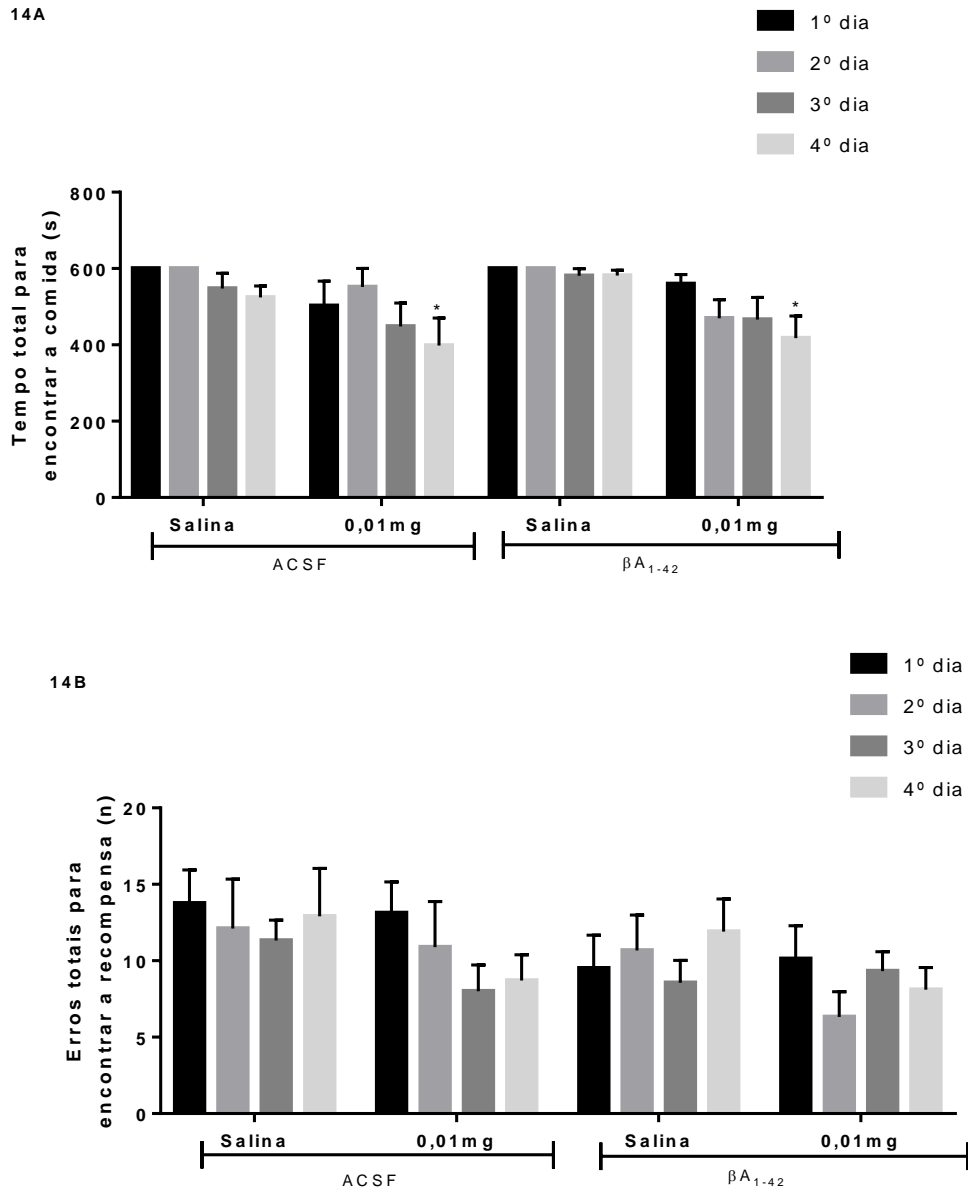


Figura 14: Efeito do tratamento com Liraglutida (0,01mg) no teste do labirinto octagonal em camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 14A mostra a latência em segundos para encontrar a recompensa nos 4 braços. 14B mostra os erros totais de entrada nos braços antes de encontrar a recompensa nos 4 braços. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo dia do βA_{1-42} .

A figura a seguir mostra os dados da habituação ao campo aberto dos machos da etapa 2. A figura 15A apresenta os resultados dos números de cruzamentos entre treino e teste. O teste t para amostras dependentes mostrou que apenas o grupo ACSF tratado com 0,01mg de Liraglutida tiveram diferença entre treino e teste no número de cruzamentos ($F(1,9) = 2,33$; $p = 0,044$). Os outros grupos não apresentaram diferenças significativas (ACSF+salina $F(1,8) = 1,26$; $p = 0,24$ / $O\beta A_{1-42}$ +salina $F(1,9) = 1,34$; $p = 0,74$ / $O\beta A_{1-42}$ +0,01mg $F(1,8) = 1,57$; $p = 0,16$). A figura 15B mostra os números de levantamentos, e pelo teste t para amostras dependentes, não mostrou diferenças nos grupos nas sessões de treino e teste (ACSF+salina $F(1,9) = 0,65$; $P = 0,53$ / ACSF+salina $F(1,8) = 1,44$; $p = 0,18$ / $O\beta A_{1-42}$ +salina $F(1,8) = 0,90$; $p = 0,39$ / $O\beta A_{1-42}$ +0,01mg $F(1,9) = 0,57$; $p = 0,58$). Pode-se observar os grupos experimentais, com exceção do ACSF +0,01mg, tiveram dano na memória de habituação, não apresentaram diferenças entre treino e teste.

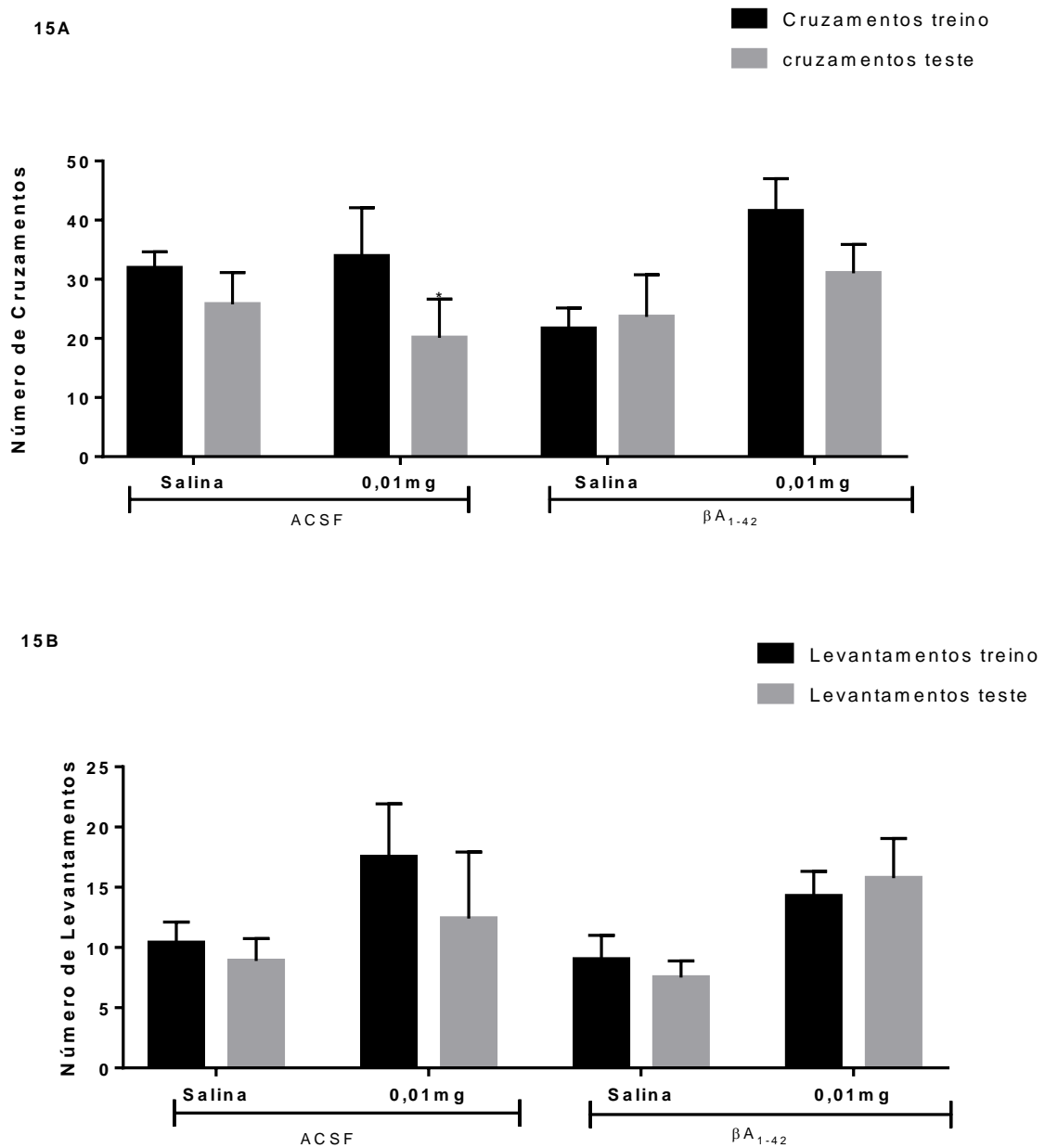


Figura 15: Efeito do tratamento com Liraglutida (0,01mg) no teste de Habituação ao campo aberto em camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 15A mostra o número de cruzamentos entre treino e teste. A figura 15B mostra o número de levantamentos entre treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao treino do mesmo grupo.

A figura 16 mostra os resultados obtidos no Labirinto em Y da etapa 2 nos machos com 12 meses de idade. A figura 16A exhibe os resultados do número de entradas nos braços. A anova de uma mostrou interação (Df(3); $F[(3,47); p=0,03$). Foi possível observar que o grupo $O\beta A_{1-42}$ +salina diminuiu o número de entradas nos braços quando comparado ao grupos ACSF+salina, porém o tratamento com 0,01mg de liraglutida aumentou o número de entrada,

aumentando a atividade exploratória dos animais, quando comparado aos animais $O\beta A_{1-42}$ +salina. A figura 16B mostra a alternância espontânea. A anova de 1 via, não mostrou interação entre os grupos ($Df(3);F(1,11) = p = 0,36$), mostrando um dano na memória espacial.

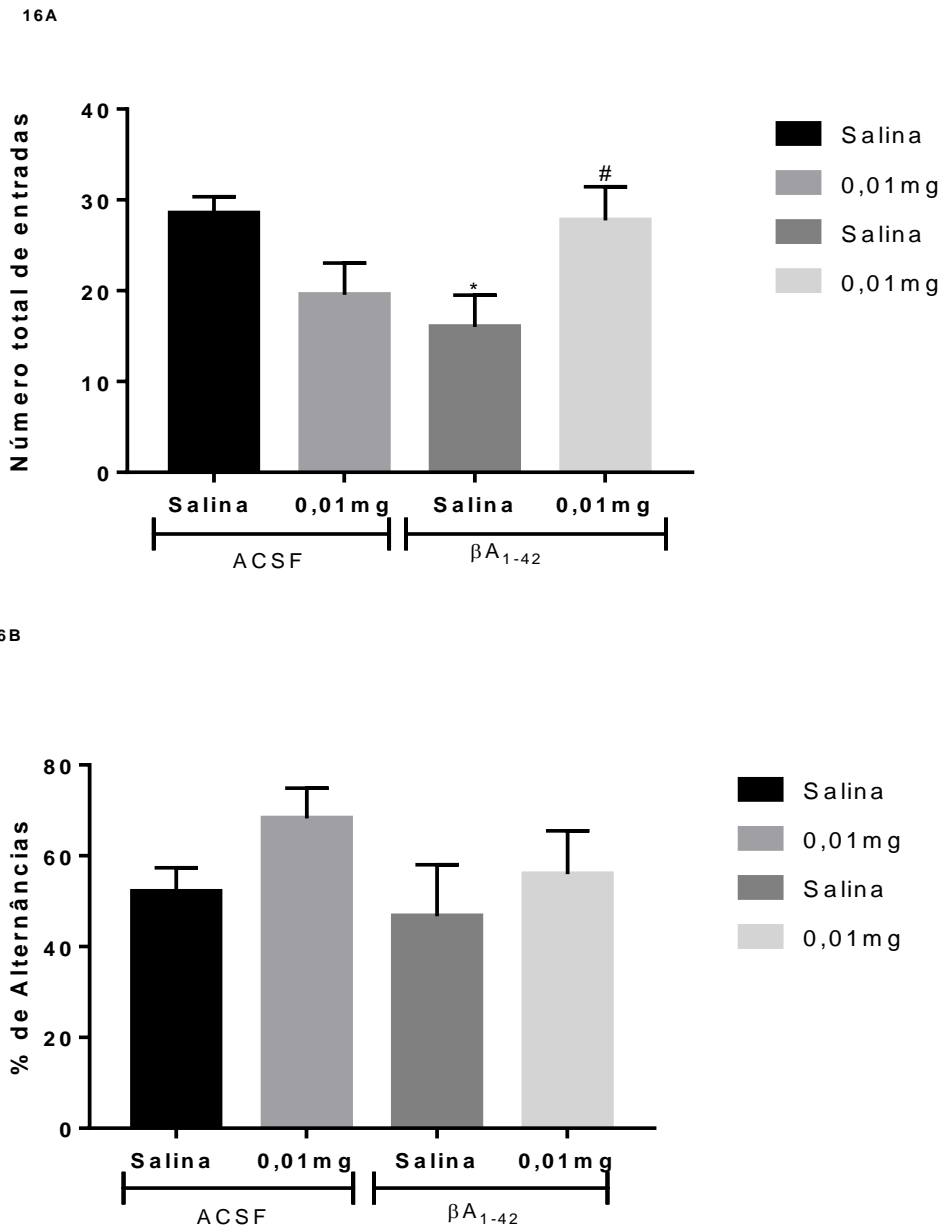


Figura 16: Efeito do tratamento de Liraglutida (0,01mg) no teste de Labirinto em Y em camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 16A mostra o número de entradas nos braços do labirinto. A figura 16B mostra a alternância espontânea. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10-12 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao ACSF + salina.

Os dados da figura 17 apresentam os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10). A figura 17A exibe os resultados dos níveis de TNF- α , e pela Anova de uma via, verificou-se, que houve um aumento nos níveis de TNF- α no grupo que recebeu injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂ tratados com salina e com 0,01mg de Liraglutida, sendo que o tratamento com Liraglutida não conseguiu reverter o aumento de TNF- α causado pelos O β A₁₋₄₂. A figura 17B, expõe os resultados dos níveis de IL-1 β , como pode ser observado, a Anova de 1 via não mostrou interação entre os grupos (Df (3); F[(0,66) = p = 0,58]). Já na figura 17C, a anova de uma via mostrou interação (Df(3); F[(3,71) = p = 0,03]). Os níveis de IL-4 foram aumentados no grupo O β A₁₋₄₂+salina quando comparado ao controle ACSF+salina (p<0,017). Porém, os animais pertencentes ao grupos O β A₁₋₄₂ tratados com 0,01mg de Liraglutida (p<0,01), reduziram os níveis de IL-4, quando comparado ao grupo O β A₁₋₄₂ +salina. O mesmo aconteceu com o grupo ACSF+0,01mg (p<0,03). A figura 17D, também houve interação pela anova de 1 via (Df(3); F[(6,50) = p = 0,004]) nos níveis de IL-10. Foi verificado que houve um aumento nos níveis de IL-10 nos animais que receberam injeção i.c.v O β A₁₋₄₂ e tratados com salina (p<0,002), quando comparado ao grupo ACSF+salina. Porém quando o tratamento com 0,01mg de Liraglutida, conseguiu reverter esse aumento de IL-10 causado pelo O β A₁₋₄₂.

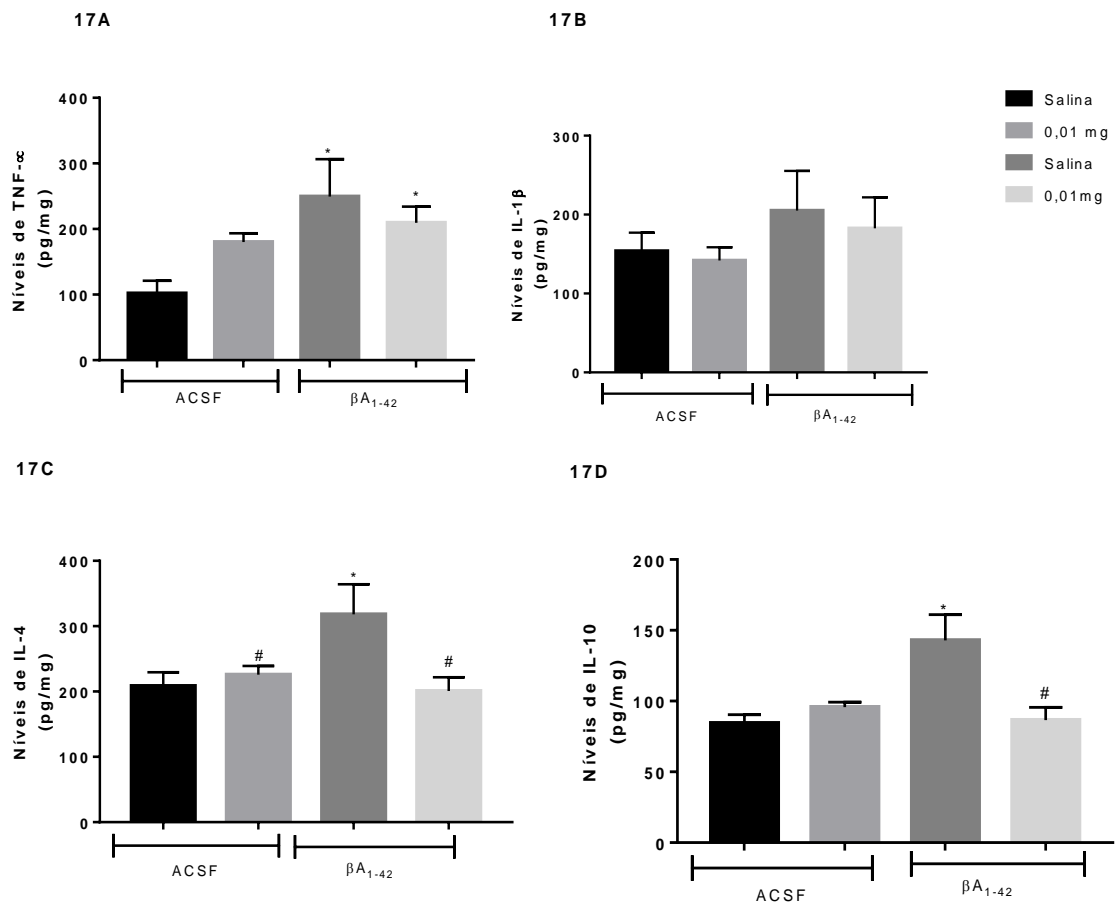
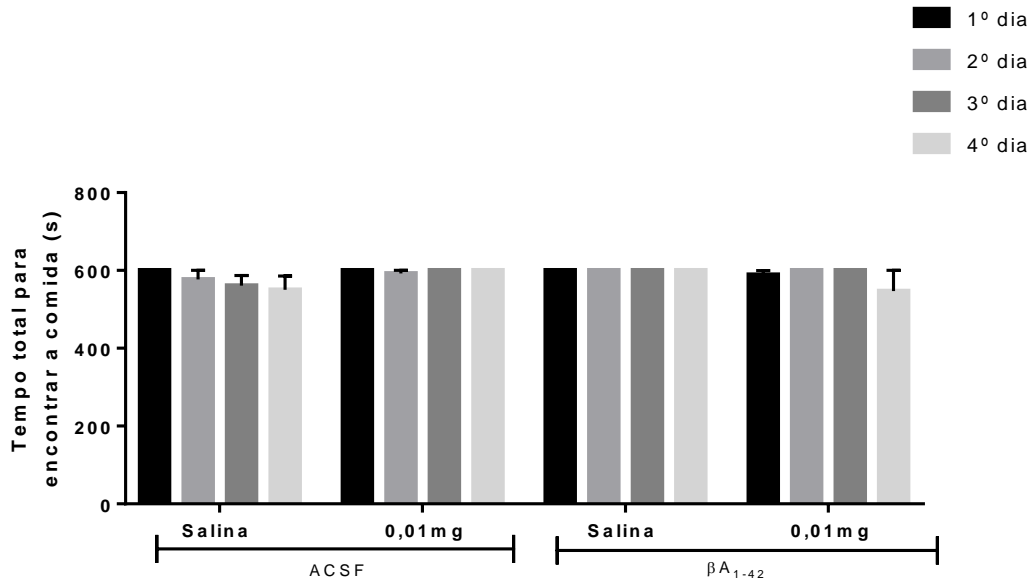


Figura 17: Efeito do tratamento de Liraglutida (0,01mg) nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 em hipocampo de camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 17A mostra os níveis de TNF- α . A figura 17B mostra os níveis de IL-1 β . A figura 17C mostra os níveis de IL-4. A figura 17D mostra os níveis de IL-10. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao ACSF + salina, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo βA_{1-42} .

As figuras a seguir são referentes dos resultados obtidos da etapa 2, fêmeas com 12 meses de idade. A figura 18A exprime os resultados do labirinto octagonal, no tempo total para encontrar a recompensa. A anova de 1 via não mostrou interação entre os grupos, em nenhum dos dias (1 $^{\circ}$ dia DF(3); F(1,08); $p=0,37$ / 2 $^{\circ}$ dia DF(3); F(0,72); $p=0,54$ / 3 $^{\circ}$ dia DF(3); F(2,08); $p=0,120$ / 4 $^{\circ}$ dia DF(3); F(0,90); $p=0,40$). O mesmo aconteceu no número totais de erros para encontrar a recompensa (1 $^{\circ}$ dia DF(3); F(0,44); $p=0,72$ / 2 $^{\circ}$ dia DF(3); F(0,28); $p=0,83$ / 3 $^{\circ}$ dia DF(3); F(0,40); $p=0,70$ / 4 $^{\circ}$ dia DF(3); F(0,60); $p=0,61$). Como pode ser observado, todos os grupos experimentais apresentaram dano na memória espacial, observado pelo tempo total e pelos erros totais para encontrar a recompensa.

18A



18B

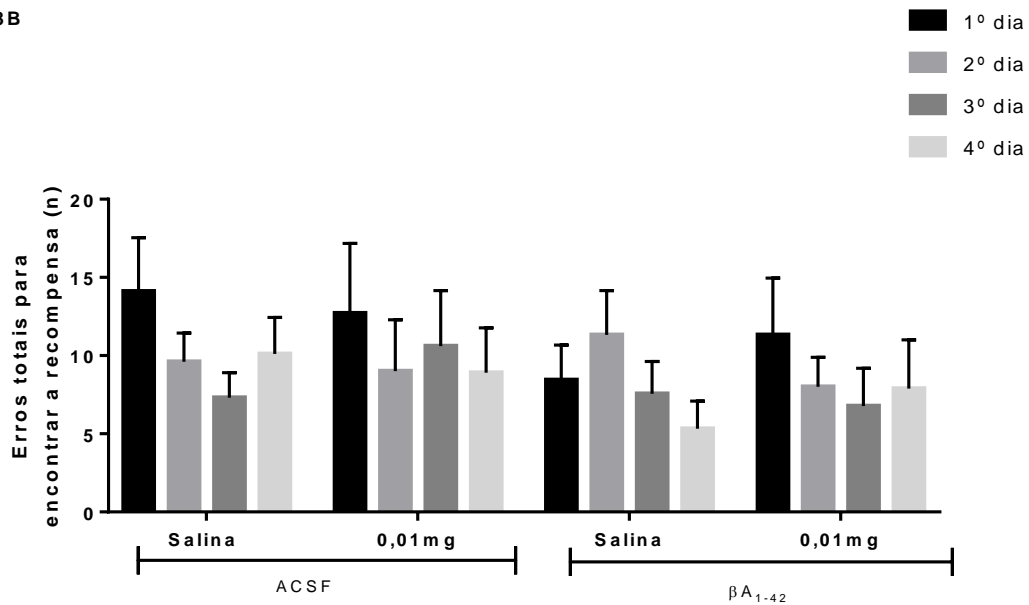


Figura 18: Efeito do tratamento com Liraglutida (0,01 mg) no teste do labirinto octagonal em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 18A mostra a latência em segundos para encontrar a recompensa nos 4 braços. 18B mostra os erros totais de entrada nos braços antes de encontrar a recompensa nos 4 braços. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo dia do βA_{1-42} .

A figura 19, mostra os resultados encontrados na habituação ao campo aberto. Os números de cruzamento são exibidos na figura 19A e foi verificado que todos os grupos da etapa 2 das fêmeas, tiveram diferenças significativas nas sessões de treino e teste, mostrado pelo test t para amostras dependentes. (ACSF+salina ($F(1,9) 2,64$; $p = 0,024$ / ACSF+0,01mg Liraglutida $F(1,9) 3,57$; $p = 0,005$ / $O\beta A_{1-42}$ +salina $F(1,8) 2,45$; $p = 0,043$ / $O\beta A_{1-42}$ +0,01mg $F(1,9) 5,76$; $p = 0,000$). A figura 19B mostra os resultados do número de levantamentos, e foi visto que apenas o grupo $O\beta A_{1-42}$ tratado com salina não houve diferenças nas sessões de treino e teste ($F(1,8) 1,29$; $p = 0,23$). Os grupos ACSF+salina, ACSF+0,01mg e $O\beta A_{1-42}$ +0,01mg, aprenderam nas sessões de treino e teste. ACSF+salina ($F(1,9) 2,30$; $p = 0,040$ / ACSF+0,01mg Liraglutida $F(1,9) 2,92$; $p = 0,01$ / $O\beta A_{1-42}$ +0,01mg $F(1,9) 4,93$; $p = 0,001$). No número de cruzamentos, todos os grupos experimentais aprenderam, ou seja, não apresentam dano na memória de habituação. Nos levantamentos apenas o grupo $O\beta A_{1-42}$ +salina tiveram um dano na memória de habituação, observado pelo número de levantamentos.

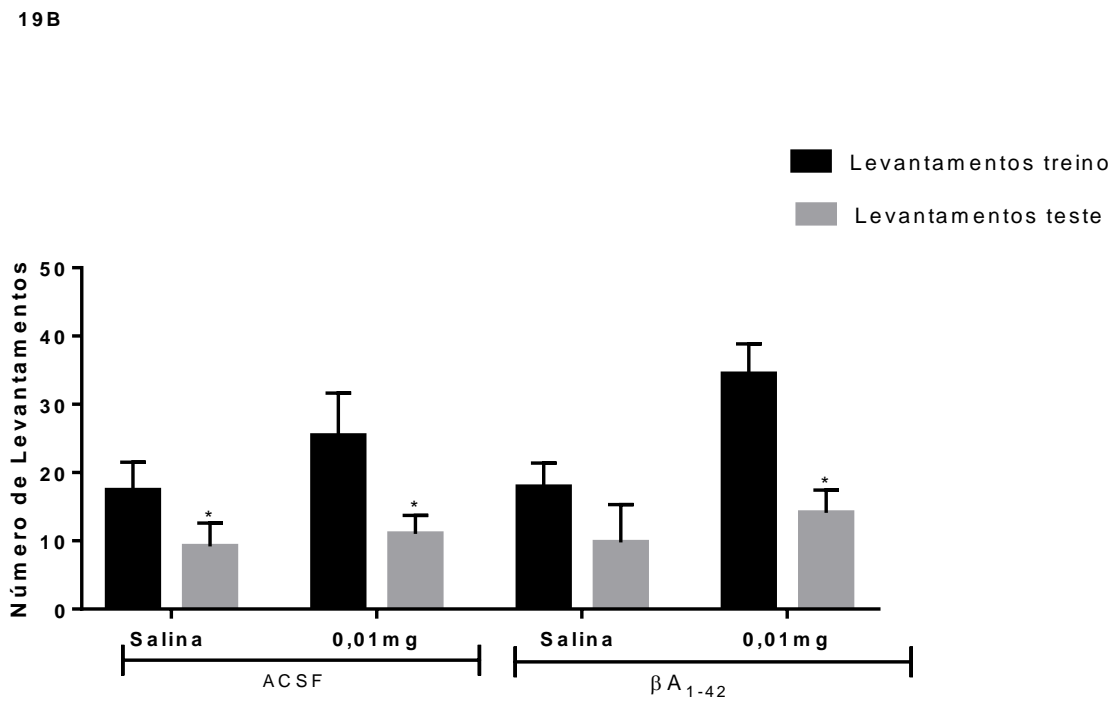
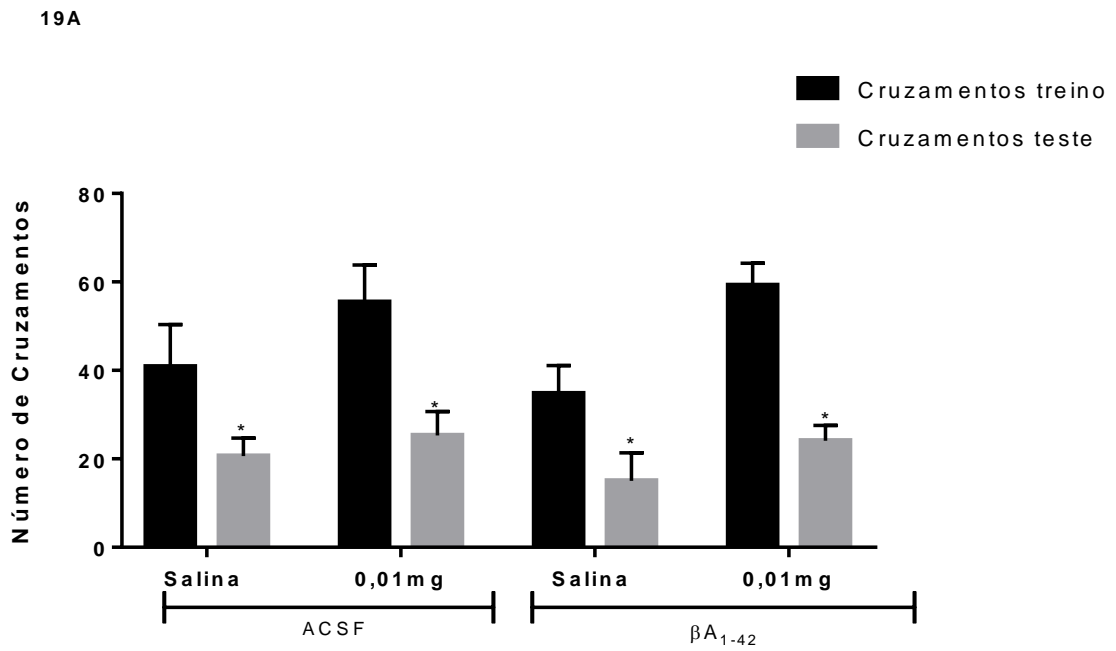


Figura 19: Efeito do tratamento com Liraglutida (0,01mg) no teste de Habituação ao campo aberto em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 19A mostra o número de cruzamentos entre treino e teste. A figura 19B mostra o número de levantamentos entre treino e teste. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 8-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao treino do mesmo grupo.

A figura 20 aponta os dados do labirinto em Y. Como demonstrado na figura 20A, não houve diferenças entre os grupos no número de entradas, não houve interação observado pela anova de 1 via (df(3); $F(1,39)$; $p=0,26$). Na figura 20B que apresenta a porcentagem de alternância espontânea, a anova de 1 via também não houve interação entre os grupos (df(3); $F(0,63)$; $p=0,60$). Nesse teste foi observado que os animais apresentaram dano cognitivo.

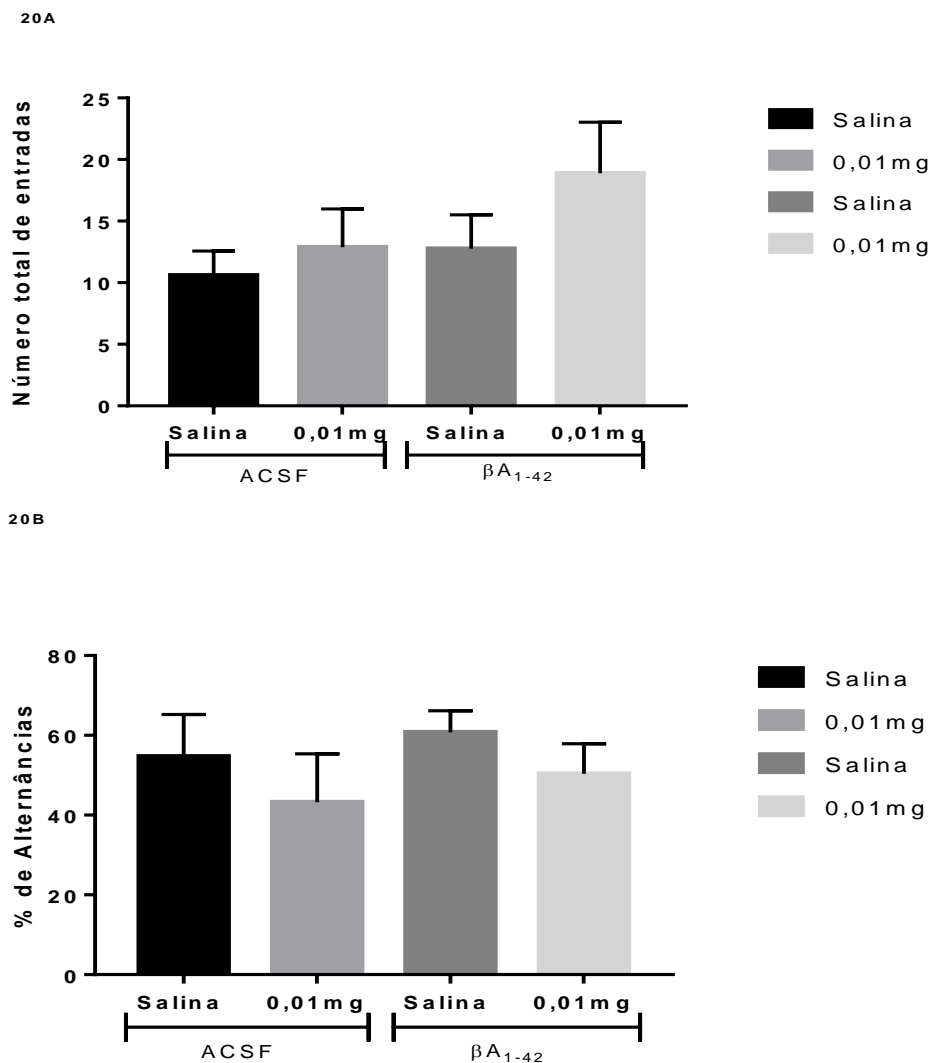


Figura 20: Efeito do tratamento de Liraglutida (0,01mg) no teste de Labirinto em Y em camundongos fêmeas C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 20A mostra o número de entradas nos braços do labirinto. A figura 20B mostra a porcentagem de alternância. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao ACSF + salina.

A figura 21 mostra os resultados de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10). Como verificado na figura 21A, a anova de 1 via mostrou interação (DF(3)F[(4,30); p = 0,020), e foi possível relatar que os níveis de TNF- α , foram aumentados no grupo ACSF tratado com 0,01mg de Liraglutida em comparação ao grupo ACSF+salina (p<0,03). E o grupo que recebeu injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂ e tratado com 0,01mg houve uma diminuição dos níveis TNF- α em relação ao O β A₁₋₄₂+salina (p<0,045). Já na figura 21B, a anova de uma via não mostrou diferença, interação entre os grupos (DF(3)F[(1,70); p = 0,20). Entretanto na figura 21C, foi possível verificar que o grupo ACSF tratados com 0,01mg (p<0,036), e o grupo O β A₁₋₄₂ tratados com salina (p<0,012), houve um aumento nos níveis de IL-4 em relação ao ACSF+salina. Porém quando os animais oba foram tratados com 0,01mg de Liraglutida, houve uma diminuição nos níveis de IL-4, em comparação com O β A₁₋₄₂ +salina. Nos níveis de IL-10 a anova de 1 via também mostrou interação (DF(3)F[(4,15); p = 0,002). No entanto o único grupo que mostrou diferença foi o grupo OBA tratado com 0,01mg, que houve uma diminuição dos níveis de IL-10 tanto em comparação ao ACSF+salina e ao O β A₁₋₄₂+salina. (O β A₁₋₄₂+0,01mg p=0,019 em relação ao ACSF+salina / O β A₁₋₄₂+0,01 p = 0,021 em relação O β A₁₋₄₂+salina).

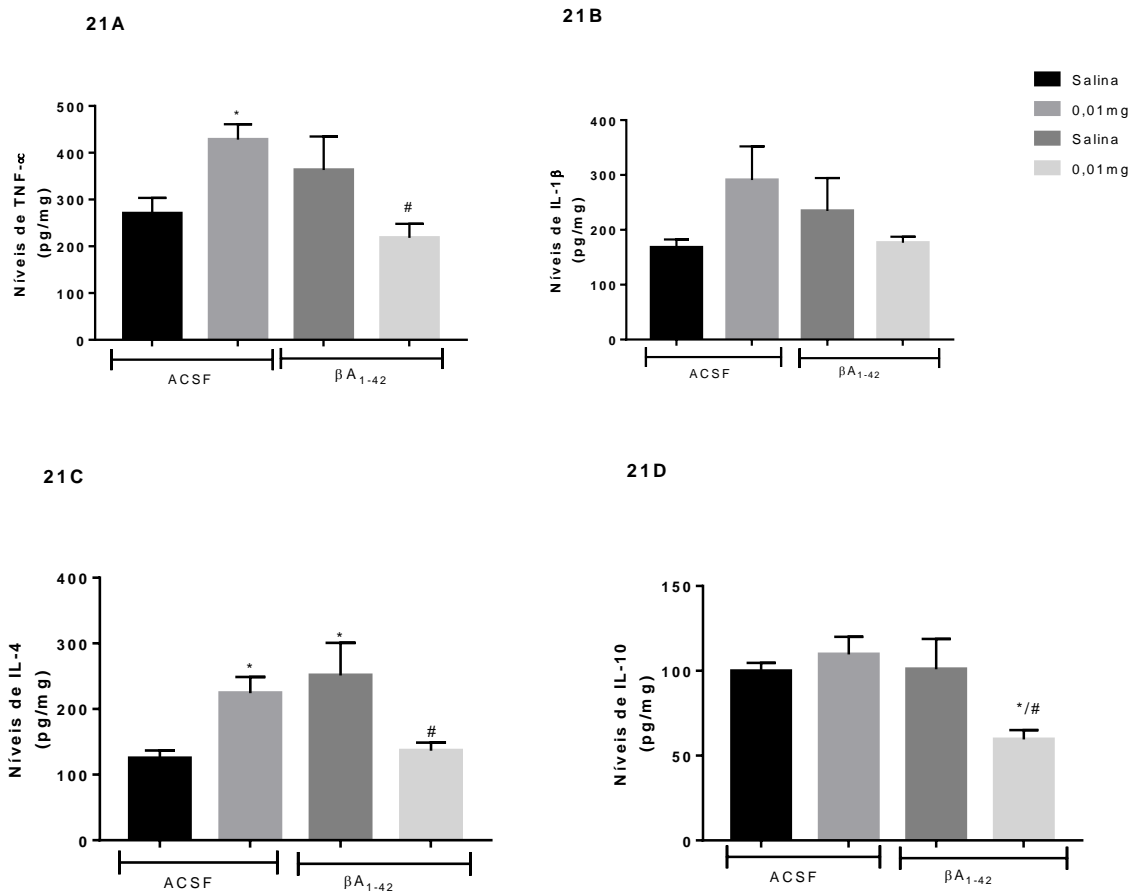


Figura 21: Efeito do tratamento de Victoza (0,01mg) nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 em hipocampo de camundongos machos C57/BL6 administrados com βA_{1-42} i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura 21A mostra os níveis de TNF- α . A figura 21B mostra os níveis de IL-1 β . A figura 21C mostra os níveis de IL-4. A figura 21D mostra os níveis de IL-10. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao ACSF + salina, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo βA_{1-42} .

5. DISCUSSÃO

A demência é definida como um estado progressivo do comprometimento das funções e capacidades cognitivas necessária para uma vida independente. Alguns fatores de risco foram identificados para a demência, como a idade e a DA (Prince et al., 2013). A idade pode ser caracterizada por um processo fisiológico do organismo, associado ao declínio cognitivo no envelhecimento (Jimenez-Rubio et al., 2017). Já a DA, é uma doença neurodegenerativa, que acomete 5 milhões de pessoas no mundo (Perusini et al., 2017). Os processos fisiopatológicos da DA, são marcados pelo acúmulo de βA e hiperfosforilação da tau (Yi, et al., 2017). Os sintomas do DA desenvolvem-se de forma branda e progridem lentamente, mais comumente começando com comprometimento da memória, seguido de deterioração de outras habilidades cognitivas, resultando em demência progressiva, com perda gradual na capacidade de realizar atividades da vida diária dos pacientes (Herukka et al., 2017). As memórias mais afetadas na DA incluem a memória episódica, em que um evento específico é lembrado conscientemente; memória semântica, em que o conhecimento conceitual de fatos é armazenado; e memória de trabalho, em que a memória armazenada recentemente é manipulada (Gold e Budson, 2008; Verma e Howard, 2012; Reijs et al., 2017).

Para avaliar a memória espacial em um modelo animal de demência do tipo AD no presente estudo, foi utilizado o labirinto octagonal e em Y. Ambos servem para avaliar a memória espacial e de trabalho, e refere-se a capacidade de aprendizagem do animal (Lee J. Y. et al., 2014). Ainda assim, os resultados da Etapa 1, mostraram que os animais machos que receberam administração i.c.v de $O\beta A_{1-42}$ e tratados com salina, levaram mais tempo para encontrar a recompensa, diminuindo o tempo apenas no último dia, e também diminuíram os erros totais apenas no último dia, mostrando que tiveram um dano na memória espacial. Porém esses animais, quando receberam tratamento com 0,001mg e 0,1mg de liraglutida tiveram uma melhora no tempo para encontrar a recompensa. Nos erros totais, os animais machos que receberam injeção i.c.v de $O\beta A_{1-42}$, tiveram uma melhora cognitiva quando tratados com 0,001mg, 0,01 e 0,1mg de liraglutida. Na habituação ao campo aberto, todos os grupos aprenderam no número de cruzamentos, com exceção do grupo ACSF + 0,001mg de liraglutida e $O\beta A_{1-42}$ +salina. Já nos números levantamentos, apenas os grupos ACSF+salina, $O\beta A_{1-42}$ tratados com 0,01mg e 0,1mg de liraglutida, aprenderam nas sessões treino e teste, melhorando a memória de habituação. Estes resultados corroboram com a literatura, em que fora visto que a administração i.c.v de $O\beta A_{1-42}$ causou dano na memória em camundongos machos, avaliados

no teste de labirinto aquático de Morris, esquiwa inibitória, labirinto octagonal, reconhecimento de objetos e habituação ao campo aberto (Borhani et al., 2017; Garcez, et al., 2017; Gong Y. H. et al., 2017; Koh et al., 2017; Rammes et al., 2017). Por outro lado, estudos comprovam que o tratamento por 8 semanas com liraglutida (300µg/kg) em camundongos machos C57/BL6 triplo transgênicos para APP/PS1/tau com 7 meses de idade, reduziu a latência de escape e aumentou o tempo no quadrante alvo no labirinto aquático de Morris (Chen S. et al., 2017). Um recente estudo, verificou que a administração i.c.v de O β A₁₋₄₂ em camundongos machos C57/BL6 causou dano de memória verificado pelo labirinto aquático de Morris, entretanto, o tratamento com liraglutida (25nmol/kg) por 8 semana não causou efeito no tempo de escape e a distância percorrida para encontrar a plataforma (Qi et al., 2017).

O teste comportamental do labirinto em Y, é um simples teste de reconhecimento para avaliar a memória espacial. Nesta tarefa, durante a primeira sessão, o animal pode explorar apenas dois braços do labirinto, com o terceiro braço bloqueado com uma porta. Durante a sessão teste, a porta é aberta e todos os três braços estão acessíveis. A discriminação da novidade *versus* familiaridade pode ser analisada comparando a exploração de animais dos três braços. Uma vez que a tarefa se baseia na tendência natural dos roedores para explorar a novidade, a preferência pela novidade e a memória podem ser avaliadas por um intervalo, entre duas sessões de treino (Conrad et al., 1997; Dellu et al., 2000; Martin et al., 2003). O resultado da etapa 1 dos machos do presente estudo mostrou, que no número de entrada foi diferente apenas nos grupos O β A₁₋₄₂ tratados com salina e com 0,1 mg/kg de liraglutida. E quando tratados com 0,01mg e 0,01mg de liraglutida, houve um aumento no número de entradas, melhorando a memória espacial. Todavia, a alternância espontânea, não foi diferente nos grupos, mostrando que a liraglutida não causou efeito na memória espacial avaliada pelo labirinto em Y. No entanto, Xu M (2016) verificou que após a injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂ em camundongos, não houve diferença no número de entradas, porém, tiveram uma diminuição na alternância espontânea (Xu M. et al., 2016). Outros resultados mostram que o tratamento com 25 nmol/dia de liraglutida por 8 semanas em camundongos machos C57/BL6, não causou efeito no número de entradas no labirinto em Y, porém aumentou o tempo no quadrante alvo observado no labirinto aquático de Morris (Qi et al., 2016). Em animais APP/PS1, o tratamento com 100 ug/dia e 500 ug/dia durante 3 meses, diminuiu o tempo de natação no labirinto aquático de Morris, melhorou a tarefa no reconhecimento de objetos, e aumentou a retenção de memória no labirinto em T, em ambas as doses, sugerindo então que a liraglutida melhorou o processos de aquisição de memória (Hansen et al., 2016b).

Até o momento, não há na literatura o tratamento em camundongos fêmeas C57/BL6 com liraglutida, e poucos são os estudos comportamentais com fêmeas. No presente estudo, foi possível observar que os animais que receberam administração i.c.v de $O\beta A_{1-42}$ não diminuíram o tempo para encontrar a recompensa em nenhum dia dos testes, mostrando que houve um dano cognitivo na memória espacial. Entretanto, os animais $O\beta A_{1-42}$, tratados com 0,01mg e 0,1mg de liraglutida, tiveram uma melhora no tempo no 3º e 4º dia de teste, melhorando a memória espacial no labirinto octagonal. Nos erros totais para encontrar a recompensa, todos os grupos experimentais aprenderam durante os treinos, porém, o grupo $O\beta A_{1-42}$ tratado com salina, cometeu mais erros para encontrar a recompensa. No teste de habituação ao campo aberto, os animais $O\beta A_{1-42}$ tratados com salina, apresentaram dano cognitivo tanto no número de cruzamentos quanto no número de levantamentos. Quando tratados com 0,01mg e 0,1mg de liraglutida, houve uma diferença nas sessões treino e teste no número de cruzamentos e levantamentos, melhorando a memória de habituação. No número de entradas no labirinto em Y, não houve diferenças entre os grupos. Na alternância espontânea, apenas o grupo ACSF+ salina diminuiu as alternâncias em comparação ao grupo ACSF+salina. De acordo com a literatura, mulheres mostram maiores deficit cognitivos do que homens no envelhecimento, e o risco para desenvolver DA é maior nas mulheres em comparação aos homens (Dye et al., 2012; Long et al., 2016). Em modelo animal de DA, animais fêmeas APP/PS1, não tiveram diferença na atividade locomotora na habituação ao campo aberto, e apresentaram um tempo maior para encontrar a plataforma no labirinto aquático de Morris (Long, et al., 2016). Segundo a literatura, animais machos tem melhor capacidade de aprendizado e memória, quando comparados com as fêmeas (Weis et al., 2017).

Atualmente, na literatura, há uma pequena quantidade de estudos mostrando a relação entre os sexos homem e mulher, macho e fêmea. Diferenças de desenvolvimento e fisiológicas entre homens e mulheres contribuem significativamente para o desenvolvimento de várias condições neurológicas e doenças, incluindo esclerose múltipla, esquizofrenia, depressão e autismo (Cahill, 2006; Pike, 2017). Um estudo para indentificar o deficit olfativo na DA, utilizou camundongos C57/BL6 5XFAD, machos e fêmeas, e verificaram que as fêmeas tiveram um comportamento melhor que os machos na tarefa de detecção olfativa em diferentes concentrações de acetato de etila, enquanto que os machos, não houve diferenças (Roddick et al., 2016). Os resultados de Menilkova (2016), evidenciaram que camundongos fêmeas transgênicos tau/APP, um modelo animal de DA, apresentaram déficit cognitivo no labirinto em Y para o reconhecimento do braço novo, em comparação com os animais selvagens, enquanto

que os machos não houve diferenças no labirinto em Y, em comparação aos animais selvagens (Melnikova et al., 2016). No presente estudo, não foi realizada comparação direta estatística entre machos e fêmeas da etapa 1, porém percebe-se que os machos tiveram uma melhor resposta em mimetizar o modelo animal de demência do tipo DA, após administração i.c.v O β A₁₋₄₂, assim como também, os animais responderam melhor ao tratamento com liraglutida, quando comparado com as fêmeas. Um estudo recente com modelo animal de DA induzido por estreptozotocina em ratos machos e fêmeas, verificaram que os machos responderam melhor ao modelo, apresentando dano cognitivo visto no labirinto aquático de Morris, enquanto que as fêmeas não responderam bem a indução do modelo, uma vez que não mostraram déficit de memória e aprendizado. Os autores deste estudo encontram aumento da produção de β A nos machos, sem aumento nas fêmeas, sugerindo então uma ação protetora causada pelo estrogênio (Bao et al., 2017).

Uma outra característica importante que acompanha a progressão da DA, é a neuroinflamação. Oligômeros e fibrilas β A, causam uma resposta inflamatória no SNC, por ativarem a resposta imune inata, provocando uma resposta inflamatória da micróglia e astrócitos (Eikelenboom et al., 2011; Calvillo et al., 2013; Morales et al., 2014; Southam et al., 2016). Durante este processo inflamatório causado pelo β A, quimiocinas, EROs, citocinas pró e antiinflamatórias, são geradas de maneira intensa, desregulando a resposta imune e levando à neurodegeneração (Minter et al., 2016). Já está bem esclarecido na literatura, um desequilíbrio na produção de citocinas TNF- α , IL-1 β , iNOS (óxido nítrico sintase), COX-2, IL-6, IL-10, TLR-4 e NF-kB em modelos animais de DA (Chaney et al., 2017; Kantarci et al., 2017; Kong et al., 2017; Ma Y. et al., 2017). Embora estudos trazem os efeitos da liraglutida como tratamento da DM2, mostrando que o tratamento pode reduzir a ativação da micróglia, níveis de IL-1 β , IL-6, níveis de nitrito, em modelo animal de diabetes (Parthasarathy e Holscher, 2013), diminuindo a ativação do NLRP3, MPO, IL-1 β , IL-18 em modelo animal de lesão pulmonar (Zhou et al., 2016), e redução de Bax/Bcl2, GSH (Glutathiona) e MDA em modelo animal de obesidade e diabetes (Gaballah et al., 2017). Ainda assim, poucos resultados trazem o efeito da liraglutida na DA. De acordo com os resultados encontrados na etapa 1 desse estudo, pode-se observar que os animais machos que receberam a administração i.c.v do O β A₁₋₄₂ tiveram aumento dos níveis de TNF- α , em comparação ao grupos ACFS tratado com salina. Além disso, liraglutida (0,001 e 0,01 mg/kg) reduziu este efeito. Surpreendentemente os níveis de IL-1 β , IL-4 e IL-10 não mostraram diferença significativa entre os grupos. Entretanto, os resultados de citocinas nas fêmeas da etapa 1 foram mais expressivos. Os animais fêmeas que receberam

injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂, mostraram níveis aumentados de TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-10 em comparação aos animais ACSF tratados com salina. Quando os animais foram tratados na 0,01 mg/kg e 0,1 mg/kg de liraglutida, houve uma diminuição de IL-4 e IL-10. Resultados de McPlan e colaboradores (2015) verificaram que a liraglutida (25 nmol/kg) reduziu a ativação microglial no córtex pela diminuição de IBA1, e atenuou a densidade de placas β A na região CA1 do hipocampo em animais machos APP/PS1 (McClean, et al., 2015). A administração de liraglutida (300 μ g/kg) por 8 semanas, reduziu os níveis de hiperfosforilação da tau, JNK e ERK1/2 em um modelo animal transgênico triplo transgênicopara a DA (Chen S., et al., 2017). A liraglutida (2,5 nm/mL) também reestabeleceu a membrana celular, vesículas sinápticas, mitocôndria e retículo endoplasmático de animais que receberam injeção intrahipocampal (i.h.) de β A₂₅₋₃₅, em modelo um animal de DA (Qi, et al., 2016). No presente estudo, não foi encontrado diferenças significativas no animais machos da etapa 1 quanto aos níveis de citocinas. Um estudo de coorte, foi possível observar em homens, que não houve diferença nos níveis plasmáticos de β A em pacientes com diagnóstico de DA para aqueles sem o diagnóstico. Os autores sugerem que pode ter acontecido um efeito protetor da testosterona para a acúmulo de β A na DA (Lee J. H. et al., 2017). Em um modelo animal de depressão, o tratamento com duloxetina, não alterou os níveis de serotonina (5-HT), e dopamina nos animais machos, enquanto que nas fêmeas, houve aumento dos níveis de serotonina e dopamina após o tratamento (Xu Y. et al., 2017).

Paralelamente aos resultado encontrados nesse estudo, o envelhecimento é um dos principais fatores de riscos para o desenvolvimento da DA. O envelhecimento então, é conhecido por ser um processo inevitável ao longo da vida, que destaca-se por uma perda progressiva da capacidade funcional das células e do organismo. Este fenômeno biológico deriva de fatores ambientais e genéticos (Minciullo, et al., 2016). Para dar continuidade ao estudo, após realizada a curva dose-resposta nos animais da etapa 1, com 3 meses de idade, foi então escolhida a dose 0,01mg de liraglutida para o tratamento nos animais da etapa 2 desse estudo, em que foram utilizados machos ou fêmeas com 12 meses de idade. A dose 0,01 mg/kg de liraglutida foi escolhida de acordo com os resultados comportamentais e bioquímicos da etapa 1. Portanto, os animais machos da etapa 2, apenas os animais tratados com 0,01mg de liraglutida, tanto os animais que receberam injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂ ou ACSF aprenderam no último dia do labirinto octagonal, no tempo para encontrar a recompensa. Entretanto, não houve diferenças significativas no erros totais para encontrar a recompensa. Já na tarefa no campo aberto, apenas o grupo ACSF tratado com 0,01mg de Liraglutida, houve uma diferença nas

sessões treino e teste no número de cruzamentos, enquanto que no número de levantamentos não houve diferenças nas mesmas sessões. Examinando esses resultados do estudo, o próprio processo de envelhecimento causou danos cognitivos. Em modelo animal de senescência acelerada (SAMP8), o tratamento com liraglutida nas doses de 100 µg/kg e 500 µg/kg durante 4 meses, melhorou a retenção e aquisição de memória no labirinto em T, assim como também foi capaz de estimular a produção de neurônios piramidais nas regiões CA1 e CA2 do hipocampo (Hansen et al., 2015). No labirinto em Y, foi possível observar que os animais do presente estudo que receberam injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂ tiveram uma diminuição no número de entradas, melhorando com o tratamento com liraglutida. Na alternância espontânea não houve diferenças entre os grupos. Os animais que receberam injeção i.h. de O β A₁₋₄₀, não apresentaram dano na memória, observado no teste de reconhecimento de objetos e no labirinto em Y, ou seja, os animais reconheceram o braço novo (Santos et al., 2017). Resultados de Pence e colaboradores (2017), não mostraram diferenças no número de entradas, na alternância espontânea e no tempo gasto em cada braço em animais com 9 meses de idade (Pence et al., 2017). Os animais fêmeas da etapa 2, obtiveram resultados diferentes dos encontrados nos animais machos, onde não apresentaram resultados significativos no teste do labirinto octogonal, e nem no labirinto em Y, porém com resultados significativos no teste do campo aberto, onde as animais que receberam tratamento com a liraglutida, demonstraram uma melhora no nível de aprendizado, visto que diminuíram significativamente a quantidade de cruzamentos e, quando analisou-se o número de levantamentos efetuados pelos mesmos animais, o único grupo que não apresentou resultados significativos foi o grupo que recebeu injeção i.c.v. do O β A₁₋₄₂ tratado com salina, demonstrando que nos animais fêmeas, o tratamento com a liraglutida foi capaz de produzir efeito neuroprotetor, melhorando o aprendizado dos animais. Resultados de Sah (2017), evidenciaram que os animais fêmeas triplo transgênico com 4 semanas de idade, não apresentam diferenças significativas na alternância espontânea no labirinto em Y, assim como não exibiram aumento nos níveis de β A, tau fosforilada e GSK3 β (Sah et al., 2017). Da mesma maneira que administração i.c.v de β A (3µg/µl) em camundongos machos não causou déficits cognitivos, quanto ao número de entradas no labirinto em Y (Maione et al., 2017).

Nos últimos anos, a inflamação tem sido uma área-chave de interesse em pesquisas relacionadas com a idade. Com o avanço da idade, o organismo desenvolve um processo conhecido como "inflamação crônica" ou *inflamm-aging*. Isto refere-se a imunossenescência, que inclui alterações normais resultantes do envelhecimento do sistema imunológico (Gruver

et al., 2007; Watson, et al., 2017). Um estudo recente, mostrou que camundongos C57/BL6 com 4 e 25 meses de idade, tiveram aumento do acúmulo de β A e aumento do número de células positivas a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), demonstrando uma resposta imunológica com o avanço da idade (Hernandez-Zimbron et al., 2017). O que pode ser constatado com os resultados de citocinas da etapa 2, é que os animais machos com 12 meses de idade tiveram aumento dos níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) nos animais que receberam injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂. o tratamento com liraglutida nos animais reduziu os níveis de IL-4 e IL-10. Em contrapartida, as fêmeas com 12 meses de idade da etapa 2, apresentaram resultados diferentes dos machos. Nesses animais, houve apenas aumento nos níveis de IL-4 no grupo que recebeu a injeção i.c.v de O β A₁₋₄₂. No entanto, quando os animais foram tratados com liraglutida (0,01 mg/kg), houve uma diminuição nos níveis de TNF- α , IL-4 e IL-10. Resultados indicam que camundongos C57/BL6 tem uma maior progressão da resposta por infecção pulmonar causada pela *Mycobacterium tuberculosis*, associado há uma maior morbidade e mortalidade nos machos em comparação com as fêmeas (Dibbern et al., 2017). Geralmente, as fêmeas adotam respostas imunes inatas e adaptativas mais altas do que os machos, o que permitem uma depuração mais rápida de agentes patogênicos, porém aumenta a suscetibilidade a doenças esporádica e auto-imunes (Klein, 2012). Até a data, não há estudos que exibem e/ou esclareçam a relação da liraglutida com inflamação e envelhecimento. Em um modelo animal de cardiotoxicidade, o tratamento durante 4 semana com liraglutida (100 μ g/kg) reduziu os níveis de TNF- α , IL-6, MDA, GSK3 β e caspase-3 (Abbas e Kabil, 2017). Do mesmo modo, em que o tratamento por 14 dias com liraglutida (50 μ g/kg) em modelo animal de esquizofrenia hepática, diminuiu os níveis de TNF- α , MDA, caspase 3 e houve uma redução da expressão de Bcl2 e atividade de GSH (Abdelsameea et al., 2017).

Segundo resultados do presente estudo, machos e fêmeas da etapa 1 e da etapa 2, apresentam comportamentos e resposta inflamatórias diferentes, quando compara-se os sexos. Os machos responderam melhor ao modelo animal de DA e ao tratamento com Liraglutida. Esses achados corroboram com a literatura, em que Pitychoutis (2009), verificou que a injeção de LPS (lipopolissacarídeo) 100 μ g/kg em machos e fêmeas não foi diferente a ativação dopaminérgica entre os sexos, porém as fêmeas tiveram um tempo maior de natação no nado forçado, e uma menor atividade locomotora em comparação aos machos. Já os machos desse estudo, não tiveram respostas nos níveis de serotonina após os estímulo com LPS. O mesmo foi observado nos resultados da etapa 1 do presente estudo, em que os machos não tiveram alterações nos níveis de citocinas após a injeção de O β A₁₋₄₂. Simpson (2012), afirmou em seu

estudo com ratos apresentando comportamentos de ansiedade, que os machos exibem mais comportamentos relacionados ao medo como congelamento e inibição locomotora, enquanto as fêmeas apresentam mais o comportamento ativo e defensivo em resposta a algum estímulo de ameaça. Essas diferenças entre os sexos estão de acordo com os dados da literatura atual sobre humanos quando relatam a evolução e o tratamento da DA transcorrendo de maneira diferente dependendo do sexo, pois levam em consideração as diferenças funcionais e anatômicas em nível cerebral, diferenças que também podem ser percebidas no decurso de outras doenças como nas doenças cardiovasculares, diabetes e hipertensão, por exemplo (Sinforiani, et al., 2010). Um estudo avaliou em 294 pacientes entre homens e mulheres com 60 anos de idade ou mais e que possuíam comprometimento cognitivo leve, como os fatores de risco da DA diferem de acordo com o sexo em indivíduos que já possuem um comprometimento cognitivo leve. Seus resultados demonstraram que as mulheres desenvolveram mais quadros de depressão ao longo da vida, quando comparado aos homens, provavelmente pela oscilação hormonal na fase da adolescência, gravidez e menopausa, e também possuíam mais alelos ApoE ϵ 4, uma variante da apolipoproteína E que está intimamente ligada ao desenvolvimento de altos níveis sanguíneos de colesterol e da DA. Enquanto que nos homens, foi encontrada alteração nos níveis de hiperlipidemia como fator de risco para o desenvolvimento da DA (Kim, et al., 2015). Além do mais, baixos níveis de estradiol em mulheres, causam um desequilíbrio no metabolismo cerebral, o que leva as mulheres terem um risco aumentado para o desenvolvimento da DA (Podcasy e Epperson, 2016).

Ao analisar os resultados do presente estudo e a falta de esclarecimentos quanto a ação da liraglutida na DA, algumas hipóteses podem ser levantadas para tentar explicar esses efeitos. Como já citado, a liraglutida melhorou parâmetros comportamentais e inflamatórios, em animais machos e fêmeas com 3 meses de idade, assim como também causou efeitos nos animais machos e fêmeas com 12 meses de idade, como demonstrado na figura 22 e 23. O que pode ser observado neste estudo, é que o tratamento com apenas 17 dias e com doses maiores do que encontrado na literatura, também causou efeitos benéficos. A liraglutida talvez possa ter causado um efeito direto ou indireto na fosforilação de IRS1, ativando a AKT, inibindo a GSK3 β e conseqüentemente inibindo a hiperfosforilação da tau. Outra hipótese, é que a liraglutida pode ter aumentado a atividade da enzima que degrada a insulina (IDE), em que estudos já comprovam que IDE faz degradação de β A em modelo animais de DA (Saido e Leissring, 2012; Stargardt et al., 2013; Kurochkin et al., 2017). Até o momento, sabe-se que a liraglutida, liga-se ao GLP-1, aumentando cAMP conseqüentemente ativando a proteína cinase

A (PKA), levando a ativação de Creb, melhorando crescimento neuronal, sinapse, reparo e regeneração. Outra via também pode ser pela ativação PI3K, PKB/AKT, inibindo a apoptose e regulando genes de respostas ao estresse (Holscher, 2014). Os efeitos da ação da liraglutida nas antiinflamatórias IL4 e IL-10, podem terem sido por uma modulação direta ou indireta na microglia, assim como também o tratamento com as doses 0,01mg e 0,1mg de liraglutida aumentaram em relação ao $O\beta A_{1-42}$ na etapa 1 nas fêmeas.

Sendo assim, os dados do presente estudo estão de acordo com os dados encontrados na literatura atual, porém, sendo este estudo o primeiro a avaliar o comportamento de camundongos machos e fêmeas com 3 e 12 meses de idade submetidos ou não ao modelo animal de demência tipo DA e tratados com liraglutida (0,001 mg/kg, 0,01 mg/kg e 0,1 mg/kg). De maneira geral, os animais machos da etapa 1 que receberam injeção i.c.v $O\beta A_{1-42}$, apresentaram dano na memória espacial observado pelo labirinto octagonal e dano na memória de habituação, e quando foram tratados com liraglutida nas doses 0,001 mg/kg, 0,01 mg/kg e 0,1 mg/kg, houve uma reversão desse dano causado pelo $O\beta A_{1-42}$. O mesmo foi observado no níveis de TNF- α , em que o tratamento com 0,001mg e 0,01mg de liraglutida, diminuiu o aumento causado pelo $O\beta A_{1-42}$. Da mesma maneira, em que as fêmeas da etapa 1, apresentaram um dano cognitivo na memória espacial e na de habituação quando receberam injeção i.c.v de $O\beta A_{1-42}$. E quando os animais receberam o tratamento com 0,01mg e 0,1mg de liraglutida, houve uma melhora na memória espacial e de habituação. Assim como, houve uma diminuição nos níveis de IL-4 e IL-10 nas doses 0,01 e 0,1mg de liraglutida, após a administração de $O\beta A_{1-42}$ (figura 22). Já na etapa 2, os animais machos ACSF+salina e $O\beta A_{1-42}$ apresentaram dano na memória espacial e na memória de habituação. Porém o tratamento com 0,01mg de liraglutida conseguiu melhorar apenas a memória de habituação, diminuindo o tempo para encontrar a recompensa. Assim como, o tratamento com 0,01mg de liraglutida diminuíram os níveis de IL-4 e IL-10 causado pelos $O\beta A_{1-42}$. Já as fêmeas da etapa 2, apresentaram dano na memória espacial após administração de $O\beta A_{1-42}$, e o tratamento com 0,01mg conseguiu reverter o dano apenas na memória de habituação. Nos níveis de citocinas, o tratamento com 0,01mg de liraglutida conseguiu diminuir os níveis de TNF- α , IL-4 e IL-10, causados por $O\beta A_{1-42}$.

Considerando que este é um estudo pioneiro, houve dificuldade de encontrar outros estudos similares, afim de se concluir e esclarecer a sinalização de liraglutida na DA (Figura 23). Assim como também, poucos são os estudos que explicam as diferenças comportamentais, bioquímicas e a resposta ao tratamento em machos e fêmeas.

As figuras a seguir resumem os resultados encontrados do presente estudo, da etapa 1 e 2.

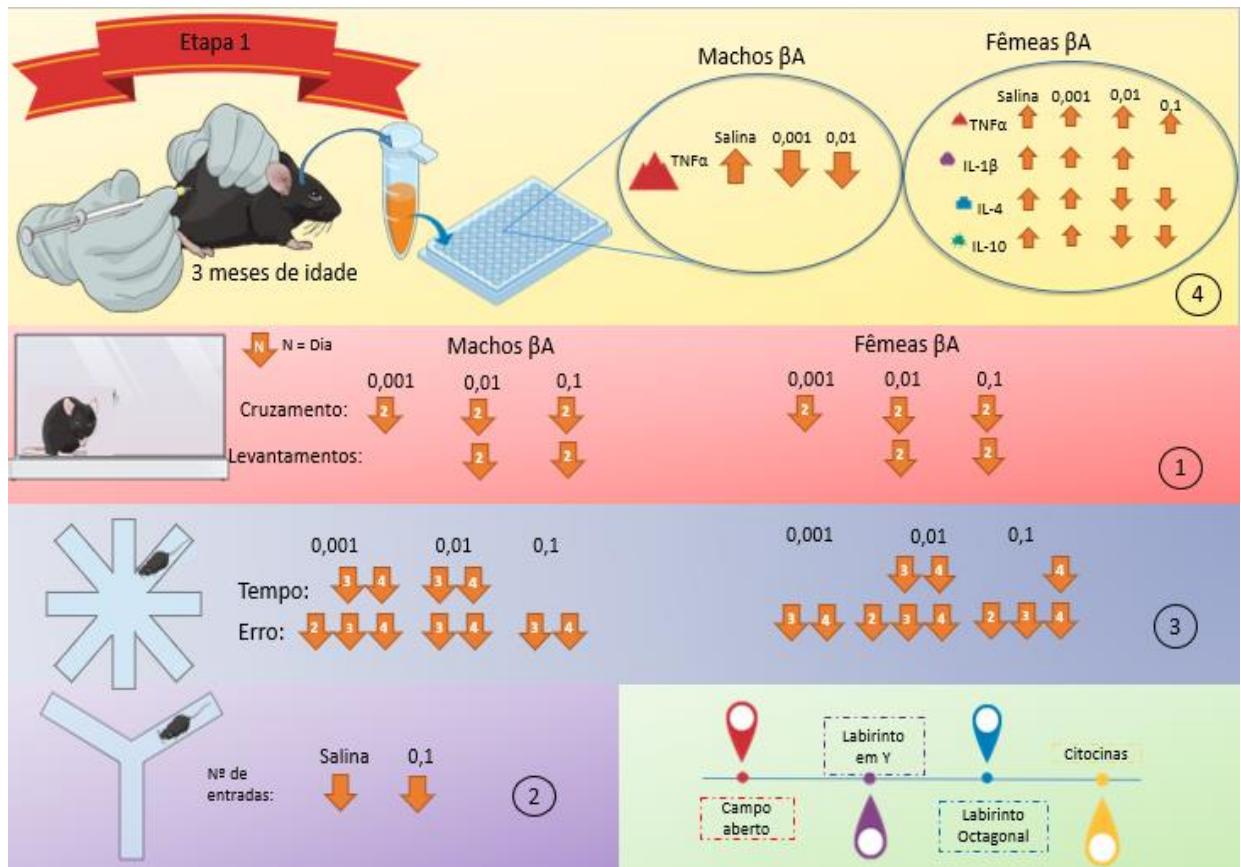


Figura 22: Resultados da Etapa 1. Ordem cronológica e resultados dos experimentos, nos camundongos C57/BL6 machos e fêmeas da etapa 1, que receberam administração i.c.v. de O β A₁₋₄₂ para indução do modelo animal de demência tipo DA. O passo 1, mostra os resultados do campo aberto no teste do número de cruzamentos e no número de levantamentos. Nos machos houve diferença entre treino e teste com o tratamento com liraglutida nas doses 0,01 e 0,1mg. O passo 2, os resultados do número de entrada no labirinto em Y, houve uma diminuição no número de entrada nos animais O β A₁₋₄₂ tratados com salina e 0,1mg de liraglutida. Passo 3, exibe os resultados do labirinto octagonal de acordo com o tratamento. Passo 4, resultados de citocinas, visto que nos machos apenas houve diferença nos níveis de TNF- α , enquanto que nas fêmeas, houve aumento das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-10 após administração de O β A₁₋₄₂ e diminuição dos níveis de IL-4 e IL-10 com o tratamento com liraglutida nas doses 0,01mg e 0,1mg/kg. Fonte: Do autor.

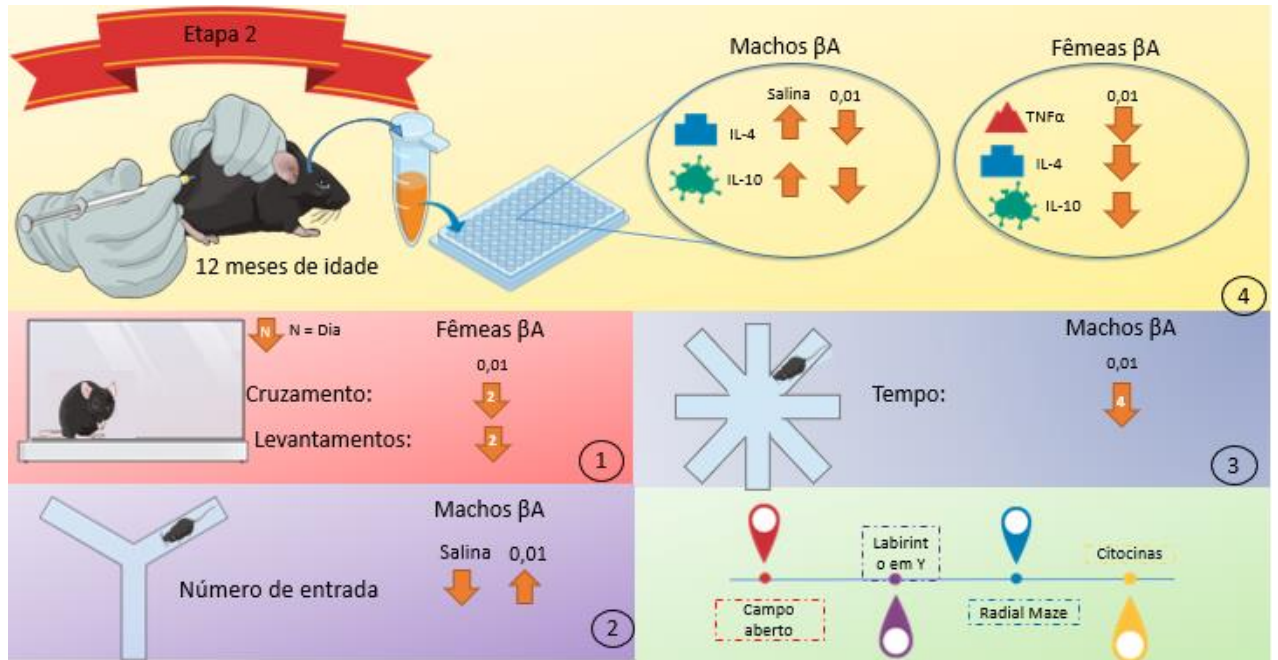


Figura 23: Resultados da Etapa 2. Ordem cronológica e resultados dos experimentos, nos camundongos C57/BL6 machos e fêmeas da etapa 2, que receberam administração i.c.v de $O\beta A_{1-42}$ para indução do modelo animal de demência tipo DA. Passo 1, mostra os resultados das fêmeas que receberam administração de $O\beta A_{1-42}$ e tratados com 0,01mg de liraglutida, tiveram diferenças entre o treino e o teste. Passo 2, resultados do labirinto em Y, em que o tratamento aumentou o número de entradas nos machos. Passo 3, o tratamento diminuiu o tempo para encontrar a comida apenas no 4º dia de teste, nos machos. Passo 4, o tratamento com liraglutida diminuiu os níveis de IL-4, IL-10 nos machos e nas fêmeas reduziu os níveis de TNF- α , IL-4, IL-10. Fonte: Do autor

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o tratameto com a liraglutida, em animais machos e fêmeas com 3 meses de idade, melhorou o dano na memória espacial e de habituação causado pela administração de O β A₁₋₄₂. A liraglutida foi capaz de promover uma melhora na memória espacial dos animais machos e na memória de habituação dos animais fêmeas com 12 meses de idade. Nos parâmetros inflamatórios, o tratamento com liraglutida melhorou os níveis de IL-4 e IL-10 nas fêmeas, sem resposta nos machos com 3 meses de idade, em comparação aos animais que receberam administração de O β A₁₋₄₂. Quanto aos animais com 12 meses de idade, a liraglutida conseguiu reduzir os níveis de TNF- α , IL-4 e IL-10 nas fêmeas, enquanto nos machos o tratamento reduziu os níveis de IL-4 e IL-10.

Portanto, este foi o primeiro estudo a avaliar o efeito da liraglutida em animais machos e fêmeas com 3 ou 12 meses, mostrando diferentes resposta entre machos e fêmeas na idade adulta ou no envelhecimento. Este estudo indica que adicionais estudos são necessários para investigar a diferença entre sexo nas repostas à doenças e aos tratamentos. Isso indica que estas direções nas repostas necessitam ser levadas em consideração em todas as doenças e tratamentos.

7. REFERENCIAS

- 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2012/03/13 ed2012. p. 131-68.
- 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2016/08/30 ed2016. p. 459-509.
- Abbas, N. A. T. and Kabil, S. L. Liraglutide ameliorates cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats through the Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017/08/07 ed2017. p. 1145-53.
- Abdelsameea, A. A., Abbas, N. A. and Abdel Raouf, S. M. Liraglutide attenuates partial warm ischemia-reperfusion injury in rat livers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2016/12/18 ed2017. p. 311-19.
- Abhijit, S., Subramanyam, M. V. V. and Devi, S. A. Grape Seed Proanthocyanidin and Swimming Exercise Protects Against Cognitive Decline: A Study on M1 Acetylcholine Receptors in Aging Male Rat Brain. *Neurochem Res.* 2017/10/11 ed2017.
- Abraham, M. A., Filippi, B. M., Kang, G. M., Kim, M. S. and Lam, T. K. Insulin action in the hypothalamus and dorsal vagal complex. *Exp Physiol.* 2014/06/29 ed2014. p. 1104-9.
- Ahmadian, G., Ju, W., Liu, L., Wyszynski, M., Lee, S. H., Dunah, A. W., Taghibiglou, C., Wang, Y., Lu, J., Wong, T. P., Sheng, M. and Wang, Y. T. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. *Embo j.* 2004/02/21 ed2004. p. 1040-50.
- Akintola, A. A. and van Heemst, D. Insulin, aging, and the brain: mechanisms and implications. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015/02/24 ed2015. p. 13.
- Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J. W. and Markesbery, W. R. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001/03/14 ed2001. p. 373-83.
- Alegre, F., Pelegrin, P. and Feldstein, A. E. Inflammasomes in Liver Fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2017/06/01 ed2017. p. 119-27.
- Avogaro, A., de Kreutzenberg, S. V. and Fadini, G. P. Insulin signaling and life span. *Pflugers Arch.* 2009/09/17 ed2010. p. 301-14.
- Bao, J., Mahaman, Y. A. R., Liu, R., Wang, J. Z., Zhang, Z., Zhang, B. and Wang, X. Sex Differences in the Cognitive and Hippocampal Effects of Streptozotocin in an Animal Model of Sporadic AD. *Front Aging Neurosci.* 2017/11/23 ed2017. p. 347.
- Barage, S. H. and Sonawane, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides.* 2015/07/08 ed2015. p. 1-18.

- Bassiony, H. S., Zickri, M. B., Metwally, H. G., Elsherif, H. A., Alghandour, S. M. and Sakr, W. Comparative Histological Study on the Therapeutic Effect of Green Tea and Stem Cells in Alzheimer's Disease Complicating Experimentally Induced Diabetes. *Int J Stem Cells*. 2015/12/04 ed2015. p. 181-90.
- Berghofer, B., Frommer, T., Haley, G., Fink, L., Bein, G. and Hackstein, H. TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J Immunol*. 2006/08/05 ed2006. p. 2088-96.
- Bhaskar, K., Maphis, N., Xu, G., Varvel, N. H., Kokiko-Cochran, O. N., Weick, J. P., Staugaitis, S. M., Cardona, A., Ransohoff, R. M., Herrup, K. and Lamb, B. T. Microglial derived tumor necrosis factor-alpha drives Alzheimer's disease-related neuronal cell cycle events. *Neurobiol Dis*. 2013/10/22 ed2014. p. 273-85.
- Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J. C., Decker, H., Silverman, M. A., Kazi, H., Melo, H. M., McClean, P. L., Holscher, C., Arnold, S. E., Talbot, K., Klein, W. L., Munoz, D. P., Ferreira, S. T. and De Felice, F. G. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated Abeta oligomers. *J Clin Invest*. 2012/04/06 ed2012. p. 1339-53.
- Borhani, M., Sharifzadeh, M., Farzaei, M. H., Narimani, Z., Sabbaghziarani, F., Gholami, M. and Rahimi, R. PROTECTIVE EFFECT OF IRIS GERMANICA L. IN Beta-AMYLOID-INDUCED ANIMAL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2017/06/24 ed2017. p. 140-48.
- Britschgi, M. and Wyss-Coray, T. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol*. 2007/08/07 ed2007. p. 205-33.
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I. and Kagan, J. C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015/01/13 ed2015. p. 257-90.
- Burns, A., Jacoby, R. and Levy, R. Psychiatric phenomena in Alzheimer's disease. I: Disorders of thought content. *Br J Psychiatry*. 1990/07/01 ed1990. p. 72-6, 92-4.
- Butterfield, D. A., Di Domenico, F. and Barone, E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. *Biochim Biophys Acta*. 2014/06/21 ed2014. p. 1693-706.
- Cahill, L. Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2006/05/12 ed2006. p. 477-84.
- Calvillo, M., Diaz, A., Limon, D. I., Mayoral, M. A., Chanez-Cardenas, M. E., Zenteno, E., Montano, L. F., Guevara, J. and Espinosa, B. Amyloid-beta(25-35) induces a permanent phosphorylation of HSF-1, but a transitory and inflammation-independent overexpression of Hsp-70 in C6 astrocytoma cells. *Neuropeptides*. 2013/07/16 ed2013. p. 339-46.
- Casado, A., Encarnacion Lopez-Fernandez, M., Concepcion Casado, M. and de La Torre, R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res*. 2007/08/28 ed2008. p. 450-8.
- Chaney, A., Bauer, M., Bochicchio, D., Smigova, A., Kassiou, M., Davies, K. E., Williams, S. R. and Boutin, H. Longitudinal investigation of neuroinflammation and metabolite profiles in

the APP^{swe} xPS1^{Deltae9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2017/11/11 ed2017.

Chen, R. Treatment effects between monotherapy of donepezil versus combination with memantine for Alzheimer disease: A meta-analysis. 2017.

Chen, S., Sun, J., Zhao, G., Guo, A., Chen, Y., Fu, R. and Deng, Y. Liraglutide Improves Water Maze Learning and Memory Performance While Reduces Hyperphosphorylation of Tau and Neurofilaments in APP/PS1/Tau Triple Transgenic Mice. *Neurochem Res.* 2017/04/07 ed2017. p. 2326-35.

Chen, Z. and Zhong, C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol.* 2013/07/16 ed2013. p. 21-43.

Choi, S. H., Kim, Y. H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D'Avanzo, C., Chen, H., Hooli, B., Asselin, C., Muffat, J., Klee, J. B., Zhang, C., Wainger, B. J., Peitz, M., Kovacs, D. M., Wolf, C. J., Wagner, S. L., Tanzi, R. E. and Kim, D. Y. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature.* 2014/10/14 ed2014. p. 274-8.

Chu, L. W. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J.* 2012/06/06 ed2012. p. 228-37.

Chuang, Y. F., Elango, P., Gonzalez, C. E. and Thambisetty, M. Midlife anticholinergic drug use, risk of Alzheimer's disease, and brain atrophy in community-dwelling older adults. *Alzheimers Dement (N Y).* 2017/10/27 ed2017. p. 471-79.

Chun, Y. S., Kwon, O. H., Oh, H. G., Kim, T. W., McIntire, L. B., Park, M. K. and Chung, S. Threonine 576 residue of amyloid-beta precursor protein regulates its trafficking and processing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015/10/17 ed2015. p. 955-60.

Conrad, C. D., Lupien, S. J., Thanasoulis, L. C. and McEwen, B. S. The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze. *Brain Res.* 1997/06/06 ed1997. p. 76-83.

Correia, S. C., Santos, R. X., Carvalho, C., Cardoso, S., Candeias, E., Santos, M. S., Oliveira, C. R. and Moreira, P. I. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res.* 2012/02/01 ed2012. p. 64-78.

Couturier, J., Stancu, I. C., Schakman, O., Pierrot, N., Huaux, F., Kienlen-Campard, P., Dewachter, I. and Octave, J. N. Activation of phagocytic activity in astrocytes by reduced expression of the inflammasome component ASC and its implication in a mouse model of Alzheimer disease. *J Neuroinflammation.* 2016/01/29 ed2016. p. 20.

Cox, P. A., Davis, D. A., Mash, D. C., Metcalf, J. S. and Banack, S. A. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc Biol Sci.* 2016/01/23 ed2016.

Craft, S. Alzheimer disease: Insulin resistance and AD--extending the translational path. *Nat Rev Neurol.* 2012/06/20 ed2012. p. 360-2.

- Cuello, A. C. Early and Late CNS Inflammation in Alzheimer's Disease: Two Extremes of a Continuum? *Trends Pharmacol Sci.* 2017/09/05 ed2017. p. 956-66.
- Czirr, E. and Wyss-Coray, T. The immunology of neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2012/04/03 ed2012. p. 1156-63.
- Danysz, W. and Parsons, C. G. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *Br J Pharmacol.* 2012/06/01 ed2012. p. 324-52.
- Datusalia, A. K. and Sharma, S. S. NF-kappaB Inhibition Resolves Cognitive Deficits in Experimental Type 2 Diabetes Mellitus through CREB and Glutamate/GABA Neurotransmitters Pathway. *Curr Neurovasc Res.* 2015/10/31 ed2016. p. 22-32.
- De Felice, F. G. and Ferreira, S. T. Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. *Diabetes.* 2014/06/17 ed2014. p. 2262-72.
- De Felice, F. G., Lourenco, M. V. and Ferreira, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement.* 2014/02/18 ed2014. p. S26-32.
- Deacon, R. M. and Rawlins, J. N. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc.* 2007/04/05 ed2006. p. 7-12.
- Dellu, F., Contarino, A., Simon, H., Koob, G. F. and Gold, L. H. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2000/02/25 ed2000. p. 31-48.
- Dhawan, G., Floden, A. M. and Combs, C. K. Amyloid-beta oligomers stimulate microglia through a tyrosine kinase dependent mechanism. *Neurobiol Aging.* 2011/12/03 ed2012. p. 2247-61.
- Di Domenico, F., Pupo, G., Giraldo, E., Badia, M. C., Monllor, P., Lloret, A., Eugenia Schinina, M., Giorgi, A., Cini, C., Tramutola, A., Butterfield, D. A., Vina, J. and Perluigi, M. Oxidative signature of cerebrospinal fluid from mild cognitive impairment and Alzheimer disease patients. *Free Radic Biol Med.* 2015/12/18 ed2016. p. 1-9.
- Dibbern, J., Eggers, L. and Schneider, B. E. Sex differences in the C57BL/6 model of Mycobacterium tuberculosis infection. *Sci Rep.* 2017/09/10 ed2017. p. 10957.
- DiCiero Miranda, M., de Bruin, V. M., Vale, M. R. and Viana, G. S. Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissue from patients with Alzheimer's disease. *Gerontology.* 2000/06/22 ed2000. p. 179-84.
- Dolle, J. P., Jaye, A., Anderson, S. A., Ahmadzadeh, H., Shenoy, V. B. and Smith, D. H. Newfound sex differences in axonal structure underlie differential outcomes from in vitro traumatic axonal injury. *Exp Neurol.* 2017/11/07 ed2017.

- Dominguez, R. O., Pagano, M. A., Marschoff, E. R., Gonzalez, S. E., Repetto, M. G. and Serra, J. A. Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurologia*. 2013/10/22 ed2014. p. 567-72.
- Duarte, A. I., Moreira, P. I. and Oliveira, C. R. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res*. 2012/04/14 ed2012. p. 384017.
- Dye, R. V., Miller, K. J., Singer, E. J. and Levine, A. J. Hormone Replacement Therapy and Risk for Neurodegenerative Diseases. *Int J Alzheimers Dis*2012.
- Eikelenboom, P., Veerhuis, R., van Exel, E., Hoozemans, J. J., Rozemuller, A. J. and van Gool, W. A. The early involvement of the innate immunity in the pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease: neuropathological, epidemiological and genetic evidence. *Curr Alzheimer Res*. 2011/02/25 ed2011. p. 142-50.
- Fang, D., Zhang, Z., Li, H., Yu, Q., Douglas, J. T., Bratasz, A., Kuppusamy, P. and Yan, S. S. Increased Electron Paramagnetic Resonance Signal Correlates with Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in an Alzheimer's disease Mouse Brain. *J Alzheimers Dis*. 2016/02/19 ed2016.
- Favero, G., Franceschetti, L., Bonomini, F. and Rodella, L. F. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. 2017. p. 1835195.
- Fenini, G., Contassot, E. and French, L. E. Potential of IL-1, IL-18 and Inflammasome Inhibition for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *Front Pharmacol*2017.
- Ferreira, S. T., Clarke, J. R., Bomfim, T. R. and De Felice, F. G. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*2014. p. S76-S83.
- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M. and De Felice, F. G. Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*. 2015/06/16 ed2015. p. 191.
- Floden, A. M. and Combs, C. K. Beta-amyloid stimulates murine postnatal and adult microglia cultures in a unique manner. *J Neurosci*. 2006/04/28 ed2006. p. 4644-8.
- Fombonne, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res*. 2009/02/17 ed2009. p. 591-8.
- Foyet, H. S., Hritcu, L., Ciobica, A., Stefan, M., Kamtchouing, P. and Cojocaru, D. Methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol*. 2010/11/13 ed2011. p. 773-9.
- Fu, Y., Chen, Y., Li, L., Wang, Y., Kong, X. and Wang, J. Food restriction affects Y-maze spatial recognition memory in developing mice. *Int J Dev Neurosci*. 2017/04/06 ed2017. p. 8-15.
- Gaballah, H. H., Zakaria, S. S., Mwafy, S. E., Tahooun, N. M. and Ebeid, A. M. Mechanistic insights into the effects of quercetin and/or GLP-1 analogue liraglutide on high-fat

diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Biomed Pharmacother.* 2017/05/30 ed2017. p. 331-39.

Garcez, M. L., Mina, F., Bellettini-Santos, T., Carneiro, F. G., Luz, A. P., Schiavo, G. L., Andrighetti, M. S., Scheid, M. G., Bolfe, R. P. and Budni, J. Minocycline reduces inflammatory parameters in the brain structures and serum and reverses memory impairment caused by the administration of amyloid beta (1-42) in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017/03/25 ed2017. p. 23-31.

Gartlehner, G., Chapman, A., Strobelberger, M. and Thaler, K. Differences in efficacy and safety of pharmaceutical treatments between men and women: an umbrella review. *PLoS One.* 2010/08/07 ed2010. p. e11895.

Gobinath, A. R., Choleris, E. and Galea, L. A. Sex, hormones, and genotype interact to influence psychiatric disease, treatment, and behavioral research. *J Neurosci Res.* 2016/11/22 ed2017. p. 50-64.

Gold, C. A. and Budson, A. E. Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. *Expert Rev Neurother.* 2008/12/18 ed2008. p. 1879-91.

Gomes, G. M., Dalmolin, G. D., Cordeiro, M. d. N., Gomez, M. V., Ferreira, J. and Rubin, M. A. The selective A-type K⁺ current blocker Tx3-1 isolated from the *Phoneutria nigriventer* venom enhances memory of naïve and A β 25-35-treated mice. *Toxicon*2013. p. 23-27.

Gong, C. X. and Iqbal, K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem.* 2008/10/16 ed2008. p. 2321-8.

Gong, Y. H., Hua, N., Zang, X., Huang, T. and He, L. Melatonin ameliorates Abeta1-42 - induced Alzheimer's cognitive deficits in mouse model. 2017.

Greenberg, D. A. and Jin, K. Neurodegeneration and neurogenesis: focus on Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2006/02/14 ed2006. p. 25-8.

Greene, A., Ng, J., Shepherd, L. and Carey, K. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: what is the connection? *Consult Pharm.* 2015/02/20 ed2015. p. 112-5.

Greig, S. L. Memantine ER/Donepezil: A Review in Alzheimer's Disease. *CNS Drugs.* 2015/11/01 ed2015. p. 963-70.

Groeneveld, O. N., Kappelle, L. J. and Biessels, G. J. Potentials of incretin-based therapies in dementia and stroke in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 2016/01/28 ed2016. p. 5-16.

Gruver, A. L., Hudson, L. L. and Sempowski, G. D. Immunosenescence of ageing. *J Pathol.* 2007/01/04 ed2007. p. 144-56.

Hansen, H. H., Fabricius, K., Barkholt, P., Kongsbak-Wismann, P., Schlumberger, C., Jelsing, J., Terwel, D., Termont, A., Pyke, C., Knudsen, L. B. and Vrang, N. Long-Term Treatment with Liraglutide, a Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Agonist, Has No Effect on beta-

Amyloid Plaque Load in Two Transgenic APP/PS1 Mouse Models of Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2016/07/16 ed2016a. p. e0158205.

Hansen, H. H., Fabricius, K., Barkholt, P., Kongsbak-Wismann, P., Schlumberger, C., Jelsing, J., Terwel, D., Termont, A., Pyke, C., Knudsen, L. B. and Vrang, N. Long-Term Treatment with Liraglutide, a Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Agonist, Has No Effect on β -Amyloid Plaque Load in Two Transgenic APP/PS1 Mouse Models of Alzheimer's Disease. *PLoS One*2016b.

Hansen, H. H., Fabricius, K., Barkholt, P., Niehoff, M. L., Morley, J. E., Jelsing, J., Pyke, C., Knudsen, L. B., Farr, S. A. and Vrang, N. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2015/04/15 ed2015. p. 877-88.

Hassanzadeh, G., Hosseini, A., Pasbakhsh, P., Akbari, M., Ghaffarpour, M., Takzare, N. and Zahmatkesh, M. Trimetazidine prevents oxidative changes induced in a rat model of sporadic type of Alzheimer's disease. *Acta Med Iran*. 2015/01/20 ed2015. p. 17-24.

Hatanaka, H., Hanyu, H., Fukasawa, R., Sato, T., Shimizu, S. and Sakurai, H. Peripheral oxidative stress markers in diabetes-related dementia. *Geriatr Gerontol Int*. 2015/11/05 ed2015.

Havrankova, J., Roth, J. and Brownstein, M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978/04/27 ed1978. p. 827-9.

Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A. and Evans, D. A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013/02/08 ed2013. p. 1778-83.

Hegarty, M. Ability and sex differences in spatial thinking: What does the mental rotation test really measure? *Psychon Bull Rev*. 2017/08/16 ed2017.

Henderson, Y. O., Nalloor, R., Vazdarjanova, A., Murphy, A. Z. and Parent, M. B. Sex-dependent effects of early life inflammatory pain on sucrose intake and sucrose-associated hippocampal Arc expression in adult rats. *Physiol Behav*2017. p. 1-8.

Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T. and Kummer, M. P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015/03/21 ed2015. p. 388-405.

Heneka, M. T., Golenbock, D. T. and Latz, E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol*. 2015/02/18 ed2015. p. 229-36.

Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T. C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E. and Golenbock, D. T. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2012/12/21 ed2013. p. 674-8.

Heneka, M. T., Wiesinger, H., Dumitrescu-Ozimek, L., Riederer, P., Feinstein, D. L. and Klockgether, T. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001/09/15 ed2001. p. 906-16.

Heni, M., Kullmann, S., Ketterer, C., Guthoff, M., Bayer, M., Staiger, H., Machicao, F., Haring, H. U., Preissl, H., Veit, R. and Fritsche, A. Differential effect of glucose ingestion on the neural processing of food stimuli in lean and overweight adults. *Hum Brain Mapp.* 2013/01/12 ed2014. p. 918-28.

Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S. P., Wu, J. F., Carney, J. M. and et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 1995/11/01 ed1995. p. 2146-56.

Heppner, F. L., Ransohoff, R. M. and Becher, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2015/05/21 ed2015. p. 358-72.

Hernandez-Zimbron, L. F., Perez-Hernandez, M., Torres-Romero, A., Gorostieta-Salas, E. and Gonzalez-Salinas, R. Markers of Alzheimer's Disease in Primary Visual Cortex in Normal Aging in Mice. 2017. p. 3706018.

Hernandez, F., Gomez de Barreda, E., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J. J. and Avila, J. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol.* 2009/09/29 ed2010. p. 322-5.

Herukka, S. K., Simonsen, A. H., Andreasen, N., Baldeiras, I., Bjerke, M., Blennow, K., Engelborghs, S., Frisoni, G. B., Gabryelewicz, T., Galluzzi, S., Handels, R., Kramberger, M. G., Kulczynska, A., Molinuevo, J. L., Mroczko, B., Nordberg, A., Oliveira, C. R., Otto, M., Rinne, J. O., Rot, U., Saka, E., Soininen, H., Struyfs, H., Suardi, S., Visser, P. J., Winblad, B., Zetterberg, H. and Waldemar, G. Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement.* 2017/03/28 ed2017. p. 285-95.

Holscher, C. The incretin hormones glucagonlike peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are neuroprotective in mouse models of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014/02/18 ed2014. p. S47-54.

Hritcu, L., Cioanca, O. and Hancianu, M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. *Phytomedicine.* 2012/03/10 ed2012. p. 529-34.

Huang, L., Yang, L., Shen, X. and Yan, S. Relationship between glycated hemoglobin A1c and cognitive function in nondemented elderly patients with type 2 diabetes. *Metab Brain Dis.* 2015/11/05 ed2015.

Idring, S., Lundberg, M., Sturm, H., Dalman, C., Gumpert, C., Rai, D., Lee, B. K. and Magnusson, C. Changes in prevalence of autism spectrum disorders in 2001-2011: findings from the Stockholm youth cohort. *J Autism Dev Disord.* 2014/12/06 ed2015. p. 1766-73.

Ikram, M. A., Bersano, A., Manso-Calderon, R., Jia, J. P., Schmidt, H., Middleton, L., Nacmias, B., Siddiqi, S. and Adams, H. H. Genetics of vascular dementia - review from the ICVD working group. *BMC Med.* 2017/03/07 ed2017. p. 48.

Jaworski, T., Kugler, S. and Van Leuven, F. Modeling of tau-mediated synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2010/09/24 ed2010.

Jayaraman, A. and Pike, C. J. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: multiple mechanisms contribute to interactions. *Curr Diab Rep.* 2014/02/15 ed2014. p. 476.

Ji, L., Zhao, X., Lu, W., Zhang, Q. and Hua, Z. Intracellular A β and its pathological role in Alzheimer's disease: Lessons from cell and animal models. *Curr Alzheimer Res.* 2016/01/31 ed2016.

Jimenez-Rubio, G., Herrera-Perez, J. J., Hernandez-Hernandez, O. T. and Martinez-Mota, L. Relationship between androgen deficiency and memory impairment in aging and Alzheimer's disease. *Actas Esp Psiquiatr.* 2017/10/19 ed2017. p. 227-47.

Jo, J., Whitcomb, D. J., Olsen, K. M., Kerrigan, T. L., Lo, S. C., Bru-Mercier, G., Dickinson, B., Scullion, S., Sheng, M., Collingridge, G. and Cho, K. A β (1-42) inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 β . *Nat Neurosci.* 2011/03/29 ed2011. p. 545-7.

Jose, S. S., Bendickova, K., Kepak, T., Krenova, Z. and Fric, J. Chronic Inflammation in Immune Aging: Role of Pattern Recognition Receptor Crosstalk with the Telomere Complex? *Front Immunol.* 2017/09/21 ed2017. p. 1078.

Kantarci, A., Aytan, N., Palaska, I., Stephens, D., Crabtree, L., Benincasa, C., Jenkins, B. G., Carreras, I. and Dedeoglu, A. Combined administration of resolvin E1 and lipoxin A4 resolves inflammation in a murine model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2017/11/12 ed2017. p. 111-20.

Kapasi, A., DeCarli, C. and Schneider, J. A. Impact of multiple pathologies on the threshold for clinically overt dementia. *Acta Neuropathol.* 2017/05/11 ed2017. p. 171-86.

Kessels, H. W., Nguyen, L. N., Nabavi, S. and Malinow, R. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature.* 2010/08/13 ed2010. p. E3-4; discussion E4-5.

Kim, S., Jeong, J., Jung, H. S., Kim, B., Kim, Y. E., Lim, D. S., Kim, S. D. and Song, Y. S. Anti-inflammatory Effect of Glucagon Like Peptide-1 Receptor Agonist, Exendin-4, through Modulation of IB1/JIP1 Expression and JNK Signaling in Stroke. *Exp Neurobiol.* 2017/09/16 ed2017. p. 227-39.

Kim, S., Kim, M. J., Kim, S., Kang, H. S., Lim, S. W., Myung, W., Lee, Y., Hong, C. H., Choi, S. H., Na, D. L., Seo, S. W., Ku, B. D., Kim, S. Y., Kim, S. Y., Jeong, J. H., Park, S. A., Carroll, B. J. and Kim, D. K. Gender differences in risk factors for transition from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: A CREDOS study. *Compr Psychiatry.* 2015/09/08 ed2015. p. 114-22.

Klein, S. L. Immune cells have sex and so should journal articles. *Endocrinology*. 2012/03/22 ed2012. p. 2544-50.

Koh, E. J., Kim, K. J., Song, J. H., Choi, J., Lee, H. Y., Kang, D. H., Heo, H. J. and Lee, B. Y. Spirulina maxima Extract Ameliorates Learning and Memory Impairments via Inhibiting GSK-3beta Phosphorylation Induced by Intracerebroventricular Injection of Amyloid-beta 1-42 in Mice. *Int J Mol Sci*. 2017/11/16 ed2017.

Kong, Z. H., Chen, X., Hua, H. P., Liang, L. and Liu, L. J. The Oral Pretreatment of Glycyrrhizin Prevents Surgery-Induced Cognitive Impairment in Aged Mice by Reducing Neuroinflammation and Alzheimer's-Related Pathology via HMGB1 Inhibition. 2017. p. 385-95.

Kordjazy, N., Haj-Mirzaian, A., Haj-Mirzaian, A., Rohani, M. M., Gelfand, E. W., Rezaei, N. and Abdolghaffari, A. H. Role of toll-like receptors in inflammatory bowel disease. *Pharmacol Res*. 2017/11/21 ed2017.

Kua, E. H., Ho, E., Tan, H. H., Tsoi, C., Thng, C. and Mahendran, R. The natural history of dementia. *Psychogeriatrics*. 2014/10/18 ed2014. p. 196-201.

Kurochkin, I. V., Guarnera, E. and Berezovsky, I. N. Insulin-Degrading Enzyme in the Fight against Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2017/11/15 ed2017.

Labandeira-Garcia, J. L., Costa-Besada, M. A., Labandeira, C. M., Villar-Cheda, B. and Rodriguez-Perez, A. I. Insulin-Like Growth Factor-1 and Neuroinflammation. *Front Aging Neurosci*. 2017/11/23 ed2017. p. 365.

Laursen, S. E. and Belknap, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*. 1986/12/01 ed1986. p. 355-7.

Lavrencic, L. M., Richardson, C., Harrison, S. L., Muniz-Terrera, G., Keage, H. A. D., Brittain, K., Kirkwood, T. B. L., Jagger, C., Robinson, L. and Stephan, B. C. M. Is There a Link Between Cognitive Reserve and Cognitive Function in the Oldest-Old? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017/10/05 ed2017.

Laws, K. R., Irvine, K. and Gale, T. M. Sex differences in cognitive impairment in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry*. 2016/03/26 ed2016. p. 54-65.

Lee, J. H., Byun, M. S., Yi, D., Choe, Y. M., Choi, H. J., Baek, H., Sohn, B. K., Lee, J. Y., Kim, H. J., Kim, J. W., Lee, Y., Kim, Y. K., Sohn, C. H., Woo, J. I. and Lee, D. Y. Sex-specific association of sex hormones and gonadotropins, with brain amyloid and hippocampal neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 2017/07/12 ed2017. p. 34-40.

Lee, J. Y., Kho, S., Yoo, H. B., Park, S., Choi, J. S., Kwon, J. S., Cha, K. R. and Jung, H. Y. Spatial memory impairments in amnesic mild cognitive impairment in a virtual radial arm maze. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014. p. 653-60.

Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M. and McGowan, E. Enhanced

neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 2001/08/25 ed2001. p. 1487-91.

Li, R. and Singh, M. Sex Differences in Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Front Neuroendocrinol* 2014. p. 385-403.

Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N. E., Shankar, G. M. and Selkoe, D. J. Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci*. 2011/05/06 ed2011. p. 6627-38.

Liang, J., Kulasiri, D. and Samarasinghe, S. Computational investigation of Amyloid-beta-induced location- and subunit-specific disturbances of NMDAR at hippocampal dendritic spine in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2017/08/25 ed2017. p. e0182743.

Lilja, A. M., Rojdnier, J., Mustafiz, T., Thome, C. M., Storelli, E., Gonzalez, D., Unger-Lithner, C., Greig, N. H., Nordberg, A. and Marutle, A. Age-dependent neuroplasticity mechanisms in Alzheimer Tg2576 mice following modulation of brain amyloid-beta levels. *PLoS One*. 2013/04/05 ed2013. p. e58752.

Little, T. J., McKie, S., Jones, R. B., D'Amato, M., Smith, C., Kiss, O., Thompson, D. G. and McLaughlin, J. T. Mapping glucose-mediated gut-to-brain signalling pathways in humans. *Neuroimage*. 2014/04/02 ed2014. p. 1-11.

Liu, L. and Chan, C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2014/02/25 ed2014. p. 6-15.

Long, Z., Zeng, Q., Wang, K., Sharma, A. and He, G. Gender difference in valproic acid-induced neuroprotective effects on APP/PS1 double transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016/09/11 ed2016. p. 930-38.

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013/06/12 ed2013. p. 1194-217.

Lourenco, M. V., Clarke, J. R., Frozza, R. L., Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Batista, A. F., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Amaral, O. B., Silva, C. A., Freitas-Correa, L., Espirito-Santo, S., Campello-Costa, P., Houzel, J. C., Klein, W. L., Holscher, C., Carvalheira, J. B., Silva, A. M., Velloso, L. A., Munoz, D. P., Ferreira, S. T. and De Felice, F. G. TNF-alpha mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's beta-amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metab*. 2013/12/10 ed2013. p. 831-43.

Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M. and Markesbery, W. R. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995/08/01 ed1995. p. 1594-601.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951/11/01 ed1951. p. 265-75.

Luo, J., Warmlander, S. K., Graslund, A. and Abrahams, J. P. Reciprocal Molecular Interactions between the Abeta Peptide Linked to Alzheimer's Disease and Insulin Linked to Diabetes Mellitus Type II. *ACS Chem Neurosci*. 2016/01/21 ed2016.

Ma, L., Wang, J. and Li, Y. Insulin resistance and cognitive dysfunction. *Clin Chim Acta*. 2015/02/11 ed2015. p. 18-23.

Ma, Y., Ma, B., Shang, Y., Yin, Q., Hong, Y., Xu, S., Shen, C., Hou, X. and Liu, X. Flavonoid-rich ethanol extract from the leaves of *Diospyros kaki* attenuates cognitive deficits, amyloid-beta production, oxidative stress, and neuroinflammation in APP/PS1 transgenic mice. *Brain Res*. 2017/10/19 ed2017.

Madeira, M. H., Ambrosio, A. F. and Santiago, A. R. Glia-Mediated Retinal Neuroinflammation as a Biomarker in Alzheimer's Disease. *Ophthalmic Res*. 2015/10/31 ed2015. p. 204-11.

Maione, F., Piccolo, M., De Vita, S., Chini, M. G., Cristiano, C., De Caro, C., Lippiello, P., Miniaci, M. C., Santamaria, R., Irace, C., De Feo, V., Calignano, A., Mascolo, N. and Bifulco, G. Down regulation of pro-inflammatory pathways by tanshinone IIA and cryptotanshinone in a non-genetic mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Res*. 2017/11/22 ed2017.

Man, S. M., Karki, R. and Kanneganti, T. D. DNA-sensing inflammasomes: regulation of bacterial host defense and the gut microbiota. *Pathog Dis*. 2016/04/09 ed2016. p. ftw028.

Maqbool, M., Mobashir, M. and Hoda, N. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2015/11/13 ed2016. p. 63-81.

Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafaci, J. A. and Freedman, M. L. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1998/03/26 ed1998. p. 40-4.

Margolis, R. U. and Altszuler, N. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature*. 1967/09/23 ed1967. p. 1375-6.

Martin, S., Jones, M., Simpson, E. and van den Buuse, M. Impaired spatial reference memory in aromatase-deficient (ArKO) mice. *Neuroreport*. 2003/10/17 ed2003. p. 1979-82.

Matsuda, M., Liu, Y., Mahankali, S., Pu, Y., Mahankali, A., Wang, J., DeFronzo, R. A., Fox, P. T. and Gao, J. H. Altered hypothalamic function in response to glucose ingestion in obese humans. *Diabetes*. 1999/09/10 ed1999. p. 1801-6.

Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E. and Bateman, R. J. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010/12/15 ed2010. p. 1774.

McClellan, P. L., Jalewa, J. and Holscher, C. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice. *Behav Brain Res*. 2015/07/25 ed2015. p. 96-106.

- Melnikova, T., Park, D., Becker, L., Lee, D., Cho, E., Sayyida, N., Tian, J., Bandeen-Roche, K., Borchelt, D. R. and Savonenko, A. V. Sex-related dimorphism in dentate gyrus atrophy and behavioral phenotypes in an inducible tTa:APP^{si} transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2016/10/19 ed2016. p. 171-85.
- Meylan, E., Tschopp, J. and Karin, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature.* 2006/07/11 ed2006. p. 39-44.
- Minciullo, P. L., Catalano, A., Mandraffino, G., Casciaro, M., Crucitti, A., Maltese, G., Morabito, N., Lasco, A., Gangemi, S. and Basile, G. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015/12/15 ed2016. p. 111-26.
- Minter, M. R., Taylor, J. M. and Crack, P. J. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. 2016. p. 457-74.
- Montine, T. J., Kaye, J. A., Montine, K. S., McFarland, L., Morrow, J. D. and Quinn, J. F. Cerebrospinal fluid abeta42, tau, and f2-isoprostane concentrations in patients with Alzheimer disease, other dementias, and in age-matched controls. *Arch Pathol Lab Med.* 2001/03/22 ed2001. p. 510-2.
- Moore, S., Evans, L. D., Andersson, T., Portelius, E., Smith, J., Dias, T. B., Saurat, N., McGlade, A., Kirwan, P., Blennow, K., Hardy, J., Zetterberg, H. and Livesey, F. J. APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons. *Cell Rep.* 2015/04/30 ed2015. p. 689-96.
- Morales, I., Guzman-Martinez, L., Cerda-Troncoso, C., Farias, G. A. and Maccioni, R. B. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci.* 2014/05/06 ed2014. p. 112.
- Moreira, P. I. High-sugar diets, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013/05/10 ed2013. p. 440-5.
- Morris, J. K., Honea, R. A., Vidoni, E. D., Swerdlow, R. H. and Burns, J. M. Is Alzheimer's disease a systemic disease? *Biochim Biophys Acta.* 2014/04/22 ed2014. p. 1340-9.
- Muratli, S., Tufan, F., Soylyuk, O., Bahat, G. and Karan, M. A. Importance of hypoglycemia on the risk of Alzheimer's disease in elderly subjects with diabetes mellitus. *Clin Interv Aging.* 2015/12/02 ed2015. p. 1789-91.
- Muratore, C. R., Rice, H. C., Srikanth, P., Callahan, D. G., Shin, T., Benjamin, L. N., Walsh, D. M., Selkoe, D. J. and Young-Pearse, T. L. The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet.* 2014/02/15 ed2014. p. 3523-36.
- Nakamura, A., Osonoi, T. and Terauchi, Y. Relationship between urinary sodium excretion and pioglitazone-induced edema. *J Diabetes Investig.* 2010/10/19 ed2010. p. 208-11.
- Neth, B. J. and Craft, S. Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages. *Front Aging Neurosci.* 2017/11/23 ed2017. p. 345.

Nimmrich, V. and Ebert, U. Is Alzheimer's disease a result of presynaptic failure? Synaptic dysfunctions induced by oligomeric beta-amyloid. *Rev Neurosci*. 2009/06/17 ed2009. p. 1-12.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. and LaFerla, F. M. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003/08/05 ed2003. p. 409-21.

Page, K. A., Chan, O., Arora, J., Belfort-Deaguiar, R., Dzuira, J., Roehmholdt, B., Cline, G. W., Naik, S., Sinha, R., Constable, R. T. and Sherwin, R. S. Effects of fructose vs glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. *Jama*. 2013/01/03 ed2013. p. 63-70.

Palmer, A. M. and Burns, M. A. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1994/05/09 ed1994. p. 338-42.

Parthsarathy, V. and Holscher, C. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. *Eur J Pharmacol*. 2013/01/02 ed2013. p. 42-50.

Pence, B. D., Bhattacharya, T. K., Park, P., Rytych, J. L., Allen, J. M., Sun, Y., McCusker, R. H., Kelley, K. W., Johnson, R. W., Rhodes, J. S. and Woods, J. A. Long-term supplementation with EGCG and beta-alanine decreases mortality but does not affect cognitive or muscle function in aged mice. *Exp Gerontol*. 2017/08/19 ed2017. p. 22-29.

Perez-Losada, F. L., Jane-Salas, E., Sabater-Recolons, M. M., Estrugo-Devesa, A., Segura-Egea, J. J. and Lopez-Lopez, J. Correlation between periodontal disease management and metabolic control of type 2 diabetes mellitus. A systematic literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016/02/02 ed2016. p. 0.

Perry, T., Lahiri, D. K., Sambamurti, K., Chen, D., Mattson, M. P., Egan, J. M. and Greig, N. H. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *J Neurosci Res*. 2003/05/16 ed2003. p. 603-12.

Perusini, J. N., Cajigas, S. A., Cohensedgh, O., Lim, S. C., Pavlova, I. P., Donaldson, Z. R. and Denny, C. A. Optogenetic stimulation of dentate gyrus engrams restores memory in Alzheimer's disease mice. 2017. p. 1110-22.

Pike, C. J. Sex and the development of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2017. p. 671-80.

Pisitkun, P., Deane, J. A., Difilippantonio, M. J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A. B. and Bolland, S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*. 2006/05/20 ed2006. p. 1669-72.

Plum, L., Schubert, M. and Bruning, J. C. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*. 2005/03/01 ed2005. p. 59-65.

Podcasy, J. L. and Epperson, C. N. Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues Clin Neurosci.* 2017/02/10 ed2016. p. 437-46.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W. and Ferri, C. P. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 2013/01/12 ed2013. p. 63-75.e2.

Qi, L., Chen, Z., Wang, Y., Liu, X., Liu, X., Ke, L., Zheng, Z., Lin, X., Zhou, Y., Wu, L. and Liu, L. Subcutaneous liraglutide ameliorates methylglyoxal-induced Alzheimer-like tau pathology and cognitive impairment by modulating tau hyperphosphorylation and glycogen synthase kinase-3 β . *Am J Transl Res*2017. p. 247-60.

Qi, L., Ke, L., Liu, X., Liao, L., Ke, S., Liu, X., Wang, Y., Lin, X., Zhou, Y., Wu, L., Chen, Z. and Liu, L. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3 β pathway in an amyloid beta protein induced alzheimer disease mouse model. *Eur J Pharmacol.* 2016/05/02 ed2016. p. 23-32.

Radi, E., Formichi, P., Battisti, C. and Federico, A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 2014/07/25 ed2014. p. S125-52.

Raffield, L. M., Brenes, G. A., Cox, A. J., Freedman, B. I., Hugenschmidt, C. E., Hsu, F. C., Xu, J., Wagner, B. C., Williamson, J. D., Maldjian, J. A. and Bowden, D. W. Associations between anxiety and depression symptoms and cognitive testing and neuroimaging in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2015/10/20 ed2016. p. 143-9.

Rammes, G., Mattusch, C., Wulff, M., Seeser, F., Kreuzer, M., Zhu, K., Deussing, J. M., Herms, J. and Parsons, C. G. Involvement of GluN2B subunit containing N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors in mediating the acute and chronic synaptotoxic effects of oligomeric amyloid-beta (A β) in murine models of Alzheimer's disease (AD). *Neuropharmacology.* 2017/02/09 ed2017. p. 100-15.

Ramtekkar, U. P., Reiersen, A. M., Todorov, A. A. and Todd, R. D. Sex and age differences in attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms and diagnoses: implications for DSM-V and ICD-11. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010/04/23 ed2010. p. 217-28.e1-3.

Reijs, B. L. R., Ramakers, I., Kohler, S., Teunissen, C. E., Koel-Simmelink, M., Nathan, P. J., Tsolaki, M., Wahlund, L. O., Waldemar, G., Hausner, L., Vandenberghe, R., Johannsen, P., Blackwell, A., Vanderstichele, H., Verhey, F. and Visser, P. J. Memory Correlates of Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid Markers: A Longitudinal Cohort Study. *J Alzheimers Dis.* 2017/10/07 ed2017. p. 1119-28.

Renner, M., Lacor, P. N., Velasco, P. T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W. L. and Triller, A. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron.* 2010/06/16 ed2010. p. 739-54.

Resende, R., Ferreira, E., Pereira, C. and Resende de Oliveira, C. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience.* 2008/07/16 ed2008. p. 725-37.

- Risacher, S. L., Anderson, W. H., Charil, A., Castelluccio, P. F., Shcherbinin, S., Saykin, A. J. and Schwarz, A. J. Alzheimer disease brain atrophy subtypes are associated with cognition and rate of decline. *Neurology*. 2017/10/27 ed2017.
- Roddick, K. M., Roberts, A. D., Schellinck, H. M. and Brown, R. E. Sex and Genotype Differences in Odor Detection in the 3xTg-AD and 5XFAD Mouse Models of Alzheimer's Disease at 6 Months of Age. *Chem Senses*. 2016/03/13 ed2016. p. 433-40.
- Rucklidge, J. J. Gender differences in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*. 2010/04/14 ed2010. p. 357-73.
- Ruiz-Muñoz, A. M., Nieto-Escamez, F. A., Aznar, S., Colomina, M. T. and Sanchez-Santed, F. Cognitive and histological disturbances after chlorpyrifos exposure and chronic A β (1–42) infusions in Wistar rats. *NeuroToxicology*2011. p. 836-44.
- Sadowsky, C. H. and Galvin, J. E. Guidelines for the management of cognitive and behavioral problems in dementia. *J Am Board Fam Med*. 2012/05/10 ed2012. p. 350-66.
- Sah, S. K., Lee, C., Jang, J. H. and Park, G. H. Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017/09/04 ed2017. p. 731-36.
- Saido, T. and Leissring, M. A. Proteolytic degradation of amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012/06/08 ed2012. p. a006379.
- Saint-Laurent Thibault, C., Ozer Stillman, I., Chen, S., Getsios, D., Proskorovsky, I., Hernandez, L. and Dixit, S. Cost-utility analysis of memantine extended release added to cholinesterase inhibitors compared to cholinesterase inhibitor monotherapy for the treatment of moderate-to-severe dementia of the Alzheimer's type in the US. *J Med Econ*. 2015/06/19 ed2015. p. 930-43.
- Sandhir, R. and Gupta, S. Molecular and biochemical trajectories from diabetes to Alzheimer's disease: A critical appraisal. *World J Diabetes*. 2015/10/16 ed2015. p. 1223-42.
- Santos, V. V., Stark, R., Rial, D., Silva, H. B., Bayliss, J. A., Lemus, M. B. and Davies, J. S. Acyl ghrelin improves cognition, synaptic plasticity deficits and neuroinflammation following amyloid beta (A β 1-40) administration in mice. 2017.
- Schipper, H. M. Apolipoprotein E: implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiol Aging*. 2009/06/02 ed2011. p. 778-90.
- Selkoe, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002/10/26 ed2002. p. 789-91.
- Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001/03/29 ed2001. p. 741-66.
- Selkoe, D. J. and Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016/03/31 ed2016. p. 595-608.

Selkoe, D. J. and Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002/11/05 ed2003. p. 545-84.

Sengupta, U., Portelius, E., Hansson, O., Farmer, K., Castillo-Carranza, D., Woltjer, R., Zetterberg, H., Galasko, D., Blennow, K. and Kayed, R. Tau oligomers in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2017/04/07 ed2017. p. 226-35.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. and Hyman, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012/01/10 ed2011. p. a006189.

Shi, J. Q., Zhang, C. C., Sun, X. L., Cheng, X. X., Wang, J. B., Zhang, Y. D., Xu, J. and Zou, H. Q. Antimalarial drug artemisinin extenuates amyloidogenesis and neuroinflammation in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice via inhibition of nuclear factor-kappaB and NLRP3 inflammasome activation. *CNS Neurosci Ther.* 2013/02/15 ed2013. p. 262-8.

Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., MacLean, G., Orkin, S. H. and Livesey, F. J. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med.* 2012/02/22 ed2012. p. 124ra29.

Shpakov, A. O. [FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE BRAIN INSULIN SIGNALING SYSTEM IN NORM AND IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2016/02/02 ed2015. p. 1103-27.

Simpson, J., Ryan, C., Curley, A., Mulcaire, J. and Kelly, J. P. Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012/02/23 ed2012. p. 227-36.

Sinforiani, E., Citterio, A., Zucchella, C., Bono, G., Corbetta, S., Merlo, P. and Mauri, M. Impact of gender differences on the outcome of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2010/08/25 ed2010. p. 147-54.

Sinha, M., Bir, A., Banerjee, A., Bhowmick, P. and Chakrabarti, S. Multiple mechanisms of age-dependent accumulation of amyloid beta protein in rat brain: Prevention by dietary supplementation with N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol. *Neurochem Int.* 2015/10/16 ed2015.

Sinnen, B. L., Bowen, A. B., Gibson, E. S. and Kennedy, M. J. Local and Use-Dependent Effects of beta-Amyloid Oligomers on NMDA Receptor Function Revealed by Optical Quantal Analysis. *J Neurosci.* 2016/12/03 ed2016. p. 11532-43.

Smeets, P. A., de Graaf, C., Stafleu, A., van Osch, M. J. and van der Grond, J. Functional MRI of human hypothalamic responses following glucose ingestion. *Neuroimage.* 2005/01/04 ed2005. p. 363-8.

Sondag, C. M., Dhawan, G. and Combs, C. K. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation.* 2009/01/07 ed2009. p. 1.

Southam, K. A., Vincent, A. J. and Small, D. H. Do Microglia Default on Network Maintenance in Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Dis.* 2016/02/19 ed2016. p. 657-69.

Souza, M. Behavioral effects of endogenous or exogenous estradiol and. 2014. p. 505-14.

Spillantini, M. G. and Goedert, M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 2013/05/21 ed2013. p. 609-22.

Stamouli, E. C. and Politis, A. M. [Pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease]. *Psychiatriki.* 2017/01/24 ed2016. p. 264-75.

Stargardt, A., Gillis, J., Kamphuis, W., Wiemhoefer, A., Kooijman, L., Raspe, M., Benckhuijsen, W., Drijfhout, J. W., Hol, E. M. and Reits, E. Reduced amyloid-beta degradation in early Alzheimer's disease but not in the APPswePS1dE9 and 3xTg-AD mouse models. *Aging Cell.* 2013/03/29 ed2013. p. 499-507.

Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R. and de la Monte, S. M. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis.* 2005/03/08 ed2005. p. 63-80.

Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T. and Moore, K. J. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 2009/12/29 ed2010. p. 155-61.

Swardfager, W., Lanctot, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J. and Herrmann, N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2010/08/10 ed2010. p. 930-41.

Tachibana, M., Yamazaki, Y., Liu, C. C., Bu, G. and Kanekiyo, T. Pericyte implantation in the brain enhances cerebral blood flow and reduces amyloid-beta pathology in amyloid model mice. *Exp Neurol.* 2017/11/07 ed2017. p. 13-21.

Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L. Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L., Kawaguchi, K. R., Samoyedny, A. J., Wilson, R. S., Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wolf, B. A., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q. and Arnold, S. E. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest.* 2012/04/06 ed2012. p. 1316-38.

Thal, D. R., Walter, J., Saido, T. C. and Fandrich, M. Neuropathology and biochemistry of Abeta and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2014/12/24 ed2015. p. 167-82.

Todd, S., Barr, S., Roberts, M. and Passmore, A. P. Survival in dementia and predictors of mortality: a review. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2013/03/26 ed2013. p. 1109-24.

Torcia, M. G., Nencioni, L., Clemente, A. M., Civitelli, L., Celestino, I., Limongi, D., Fadigati, G., Perissi, E., Cozzolino, F., Garaci, E. and Palamara, A. T. Sex differences in the response to viral infections: TLR8 and TLR9 ligand stimulation induce higher IL10 production in males. *PLoS One.* 2012/07/07 ed2012. p. e39853.

Touchon, J., Lachaine, J., Beauchemin, C., Granghaud, A., Rive, B. and Bineau, S. The impact of memantine in combination with acetylcholinesterase inhibitors on admission of patients with

Alzheimer's disease to nursing homes: cost-effectiveness analysis in France. *Eur J Health Econ.* 2013/08/10 ed2014. p. 791-800.

Tozzi, A., Scip, A., Tantucci, M., de Iure, A., Ghiglieri, V., Costa, C., Di Filippo, M., Borsello, T. and Calabresi, P. Region- and age-dependent reductions of hippocampal long-term potentiation and NMDA to AMPA ratio in a genetic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2014/08/12 ed2015. p. 123-33.

Trento, M., Charrier, L., Salassa, M., Merlo, S., Passera, P., Cavallo, F. and Porta, M. Depression, anxiety and cognitive function in patients with type 2 diabetes: an 8-year prospective observational study. *Acta Diabetol.* 2015/09/17 ed2015. p. 1157-66.

Ueda, K., Fukui, Y. and Kageyama, H. Amyloid β protein-induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid β protein. *Brain Res*1994. p. 240-44.

van Bloemendaal, L., Ijzerman, R. G., Ten Kulve, J. S., Barkhof, F., Diamant, M., Veltman, D. J. and van Duinkerken, E. Alterations in white matter volume and integrity in obesity and type 2 diabetes. *Metab Brain Dis.* 2016/01/28 ed2016.

van Bussel, F. C., Backes, W. H., Hofman, P. A., van Boxtel, M. P., Schram, M. T., Stehouwer, C. D., Wildberger, J. E. and Jansen, J. F. Altered hippocampal white matter connectivity in Type 2 Diabetes Mellitus and memory decrements. *J Neuroendocrinol.* 2016/01/23 ed2016.

Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A. and Nelson, L. M. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 2003/06/05 ed2003. p. 1015-22.

van Marum, R. J. Update on the use of memantine in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2009/06/27 ed2009. p. 237-47.

Verma, M. and Howard, R. J. Semantic memory and language dysfunction in early Alzheimer's disease: a review. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2012/02/03 ed2012. p. 1209-17.

Vianna, M. R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M. L., Medina, J. H. and Izquierdo, I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000/10/21 ed2000. p. 333-40.

Vieira, M. N. N., Lima-Filho, R. A. S. and De Felice, F. G. Connecting Alzheimer's disease to diabetes: Underlying mechanisms and potential therapeutic targets. *Neuropharmacology.* 2017/11/14 ed2017.

Volt, H., Garcia, J. A., Doerrier, C., Diaz-Casado, M. E., Guerra-Librero, A., Lopez, L. C., Escames, G., Tresguerres, J. A. and Acuna-Castroviejo, D. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res.* 2015/12/19 ed2016. p. 193-205.

Watson, N., Ding, B., Zhu, X. and Frisina, R. D. Chronic inflammation - inflammaging - in the ageing cochlea: A novel target for future presbycusis therapy. *Ageing Res Rev.* 2017/10/12 ed2017. p. 142-48.

- Weis, S., Hodgetts, S. and Hausmann, M. Sex differences and menstrual cycle effects in cognitive and sensory resting state networks. *Brain Cogn.* 2017/10/17 ed2017.
- Werling, D. M. and Geschwind, D. H. Understanding sex bias in autism spectrum disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013/03/12 ed2013. p. 4868-9.
- Werner, H. and LeRoith, D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: physiological and pathological aspects. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014/02/18 ed2014. p. 1947-53.
- Wooten, G. F., Currie, L. J., Bovbjerg, V. E., Lee, J. K. and Patrie, J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004/03/18 ed2004. p. 637-9.
- Xu, M., Dong, Y., Wan, S., Yan, T., Cao, J., Wu, L., Bi, K. and Jia, Y. Schisanthrin B ameliorates Abeta1-42-induced cognitive decline via restoration of GLT-1 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav.* 2016/10/25 ed2016. p. 265-73.
- Xu, Y., Ma, L., Jiang, W., Li, Y., Wang, G. and Li, R. Study of Sex Differences in Duloxetine Efficacy for Depression in Transgenic Mouse Models. *Front Cell Neurosci*2017.
- Yi, J. H., Baek, S. J., Heo, S., Park, H. J., Kwon, H., Lee, S., Jung, J., Jeon, S. J., Kim, B. C., Lee, Y. C., Ryu, J. H. and Kim, D. H. Direct pharmacological Akt activation rescues Alzheimer's disease like memory impairments and aberrant synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2017/10/29 ed2017. p. 282-92.
- Yi, L., Liu, W., Wang, Z., Ren, D. and Peng, W. Characterizing Alzheimer's disease through metabolomics and investigating anti-Alzheimer's disease effects of natural products. *Ann N Y Acad Sci.* 2017/06/21 ed2017. p. 130-41.
- Zammataro, M., Merlo, S., Barresi, M., Parenti, C., Hu, H., Sortino, M. A. and Chiechio, S. Chronic Treatment with Fluoxetine Induces Sex-Dependent Analgesic Effects and Modulates HDAC2 and mGlu2 Expression in Female Mice. *Front Pharmacol*2017.
- Zhao, W. Q., Chen, H., Quon, M. J. and Alkon, D. L. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol.* 2004/04/20 ed2004. p. 71-81.
- Zhao, W. Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., Krafft, G. A. and Klein, W. L. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *Faseb j.* 2007/08/28 ed2008. p. 246-60.
- Zhou, F., Zhang, Y., Chen, J., Hu, X. and Xu, Y. Liraglutide attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Eur J Pharmacol.* 2016/10/30 ed2016. p. 735-40.

8. ANEXO A

Aprovação do comitê de ética no uso de animais



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeito da liraglutida na memória e em mecanismos neuroquímicos de camundongos black C57/BL6 adultos machos submetidos ao modelo animal de Alzheimer induzido pelo peptídeo β -amilóide 1-42"**, registrada com o protocolo nº **061/2017-1**, sob a responsabilidade de **Josiane Budni**, junto à equipe: Francielle Gonçalves Mina, Aline Pereira da Luz, Gabriela Sheib Fernandes, Michelle Lima Garcez, Tatiani Bellettini dos Santos, Ariadne Marques de Oliveira, Julia Macieski, Gustavo Luis Schiavo, Afonso David Nkadi - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **02/05/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/05/2017 a 03/05/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico
Nº de animais	320
Idade/Peso	70 dias
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

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

Project title: **"Effect of liraglutide on memory and neurochemical mechanisms of black C57/BL6 male mice subjected to animal model of Alzheimer induced by β -amyloid peptide 1-42"**


Protocol number: **061/2017-1**

Principal Investigator: **Josiane Budni**

Researchers: **Francielle Gonçalves Mina, Aline Pereira da Luz, Gabriela Sheib Fernandes, Michelle Lima Garcez, Tatiani Bellettini dos Santos, Ariadne Marques de Oliveira, Julia Macieski, Gustavo Luis Schiavo, Afonso David Nkadi.**

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

Criciúma, 02 de maio de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

9. ANEXO B

Aprovação do comitê de ética no uso de animais



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do possível efeito protetor da Liraglutida ou Sitagliptina isoladas ou associadas com Memantina no modelo animal da doença de Alzheimer induzido pela administração do peptídeo β -amilóide1-42" Protocolo nº 079/2015-1 sob a responsabilidade de Josiane Budni e equipe: João Luciano Quevedo, Francielle Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Gustavo Luis Schiavo, Aline da Luz Pereira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 15/06/2015.

<i>Vigência do Projeto</i>	<i>01/07/2015 a 31/06/2018</i>
<i>Espécie/linhagem</i>	<i>Camundongos C57/BL6 Black</i>
<i>Nº. De animais</i>	<i>768</i>
<i>Peso/Idade</i>	<i>30g a 40g / 60 a 90 dias</i>
<i>Sexo</i>	<i>F</i>
<i>Origem</i>	<i>Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC</i>

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

Protocol number: 079/2015-1


Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: João Luciano Quevedo, Francielle Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Gustavo Luis Schiavo, Aline da Luz Pereira

Project title: *Evaluation of protective effect of liraglutide or sitagliptine alone or combined with memantine on beta-Amyloid1-42-induced Alzheimer's disease animal model*

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

Criciúma, 16 de junho de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCCHE
Coordenador da CEUA