

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Estudo dos mecanismos de déficit cognitivo associado ao envelhecimento: o papel da resposta inflamatória

LUCIANA DOMETT SIQUEIRA

Orientador: Fernando Augusto Bozza

Rio de Janeiro

2016

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

LUCIANA DOMETT SIQUEIRA

Estudo dos mecanismos de déficit cognitivo associado ao envelhecimento: o papel da resposta inflamatória

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Fernando Augusto Bozza

Rio de Janeiro

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S618 Siqueira, Luciana Dornett

Estudo dos mecanismos de déficit cognitivo associado ao
envelhecimento: o papel da resposta inflamatória / Luciana Dornett
Siqueira. – Rio de Janeiro, 2016.
xii, 84 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 54-71

1. Envelhecimento. 2. Déficit cognitivo. 3. Microglia. 4.
Neuroinflamação. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

ODD 612.67

A todos que tornaram este momento especial e possível, mesmo diante de tanta insegurança e indecisão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Fernando Augusto Bozza e Dra. Joana d'Avila, pela confiança depositada em mim, pela paciência e calma durante todos esses anos no laboratório. Agradeço também aos momentos de cobrança e a todo o conhecimento me foi me passado;

Agradeço à Dra. Patrícia Alves Reis, por todo o apoio que me deu, por sempre estar ao meu lado quando estou perdida, por ser um exemplo de comprometimento profissional, por estar sempre disposta a me ajudar e contribuir em meu crescimento profissional;

Ao Dr. Prof Hugo Caire Castro-Faria-Neto, pelo espaço cedido no laboratório;

A Tathiany Igreja, Leandro Andrade e Emílio Telles, por terem me ajudado sempre que possível, pelas horas de conversa, pelos conselhos e, principalmente, pela amizade sempre sincera;

Agradeço a todos do laboratório de Imunofarmacologia: Mônica Farah, André Ferreira, Adriana Ribeiro, Cassiano de Albuquerque, Flora Magno, Rachel Novaes, Isabel Matos, Isacláudia Azevedo, Rose Branco e todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos órgãos de apoio à pesquisa CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro;

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio aos meus sonhos, por acreditarem em mim;

A minha irmã, Juliana Domett Siqueira, pois sem ela tal momento não seria possível.

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa
emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.”*

Albert Einstein.

RESUMO

O envelhecimento populacional é um fenômeno global. O declínio fisiológico causado pelo envelhecimento é exacerbado por episódios de inflamação sistêmica, aumentando a probabilidade de ocorrência de doenças neurodegenerativas, que têm como característica central a presença de neuroinflamação. A neuroinflamação se caracteriza pela ativação da microglia, as células imunológicas residentes no sistema nervoso central. A microglia tem papel protetor contra estímulos nocivos ao SNC, no entanto, no processo de envelhecimento a eficácia das funções microgliais pode se deteriorar. Os mecanismos responsáveis pelas alterações neurológicas durante o envelhecimento ainda não são bem compreendidos, mas evidências indicam que a função microglial pode contribuir para o declínio cognitivo no envelhecimento. Este trabalho tem como objetivo avaliar o papel da inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade no déficit cognitivo associado ao envelhecimento. A inflamação sistêmica de baixa intensidade foi induzida aguda e cronicamente em camundongos Swiss Webster machos com idade entre 2-4 meses (jovens) e 14-18 meses (envelhecidos). O modelo agudo consistiu em aplicação de uma injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS, 0,3 mg/Kg) e o modelo crônico foi induzido através de injeções intraperitoneais semanais durante 7 semanas. Os grupos controles foram manipulados junto aos demais grupos, mas não foi dada nenhuma injeção a fim de não causar inflamação. A avaliação cognitiva dos animais foi feita apenas no modelo crônico, uma semana após a última injeção de LPS, através dos testes de habituação em campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris. Após isso, os cérebros foram coletados para avaliação morfológica do perfil de ativação celular da microglia, quantificação de citocinas, lipofuscina e análise de estresse oxidativo. A análise do teste de habituação em campo aberto mostrou que os animais envelhecidos exploram e se locomovem menos que os animais jovens, o desafio crônico com LPS não interferiu no resultado. A análise dos testes de reconhecimento de objetos revelou que os animais envelhecidos que foram desafiados com LPS cronicamente possuem um déficit na memória de curta duração, em comparação com os animais envelhecidos controle, os animais jovens que foram desafiados cronicamente com LPS não apresentaram diferenças no desempenho do teste. A análise do teste de labirinto aquático mostrou o efeito do LPS na perda de memória espacial dos animais envelhecidos. A análise morfológica da microglia no modelo agudo e crônico demonstrou que há células distróficas no hipocampo dos animais envelhecidos, tanto do grupo controle quanto do grupo desafiado com LPS. A análise das citocinas plasmáticas e cerebrais revelou que os animais envelhecidos possuem alteração na resolução da resposta inflamatória, apresentando diminuição de IL-4 plasmática no modelo crônico e agudo, enquanto que os animais jovens desafiados cronicamente apresentaram aumento de IL-4 e IL-10. No cérebro, os animais envelhecidos desafiados com LPS apresentaram aumento significativo de IL-1b, IL-6, IL-10 e IL-4 no modelo crônico, o que não foi visto nos animais jovens. A quantificação da autofluorescência da lipofuscina no cérebro dos animais envelhecidos demonstrou que, no modelo agudo, o LPS diminuiu o conteúdo de lipofuscina, enquanto que no modelo crônico, o conteúdo de lipofuscina nos cérebros dos animais envelhecidos se apresenta aumentado. Finalmente, a análise cerebral da concentração de HNE, produto da peroxidação lipídica e importante marcador de estresse oxidativo, indicou maior suscetibilidade dos animais envelhecidos ao estresse oxidativo. Nossos dados sugerem que a inflamação sistêmica de baixa intensidade aumenta a suscetibilidade dos animais envelhecidos a prejuízos cognitivos, que estão associados a estresse oxidativo, desregulação na produção de citocinas a nível periférico e cerebral e disfunção microglial.

Palavras-chave: envelhecimento, déficit cognitivo, microglia, neuroinflamação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Populational aging is a widespread global phenomenon. The physiological decline caused by aging is exacerbated by episodes of systemic inflammation, increasing the risk of neurodegenerative diseases, whose main characteristic is the presence of neuroinflammation. It is characterized by activation of microglia, the central nervous system-resident immune cells. Microglia has protective functions but, in the ageing process, this function may be compromised. The mechanisms involved in ageing neurological disorders are not completely understood, and data suggests that microglial functions could contribute to cognitive decline associated with aging. The aim of this study was to investigate the role of chronic systemic inflammation in cognitive impairment associated with aging. Acute and chronic low-grade systemic inflammation was induced in younger (2-4 months) and aged (14-18 months) Swiss Webster male mice. The acute model consisted of applying an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 0,3mg/Kg) and the chronic model was induced by injections of LPS for seven weeks. The control groups were manipulated but they didn't received any injections. Cognitive assessments were performed trough open field, object recognition and water maze tasks. Brains were then collected for morphological assessment of microglial activation, cytokines, lipofuscin quantifications and oxidative stress analysis. The open field task showed that the aged animals explore and move less than the young ones, chronic challenge with LPS did not affect the result. The object recognition test showed that aged mice chronically challenged with LPS had a deficit in short-term memory, compared to aged control, young animals that were challenge with LPS showed no differences in the test performance. Moreover, the water maze test showed the effect of LPS in the loss of spatial memory of aged animals in comparison with aged controls. Morphological assessment of the microglia in the acute and chronic model showed that aged mice presented dystrophic cells in the hippocampus, and LPS treatment did not affect this pattern. Analysis of plasma and brain cytokines revealed that aged animals have problems in the resolution of the inflammatory response, with a decrease in plasmatic IL-4 in both chronic and acute model, while young animals chronically challenge with LPS showed significant increase in IL-4 and IL-10. In the brain, aged animals challenge with LPS showed a significant increase in IL-1b, IL-6, IL-10 and IL-4 in the chronic model, the young animals didn't show this pattern. Autofluorescence quantification revealed that chronic systemic inflammation increased lipofuscin accumulation on brains of aged mice. Brain analysis of the concentration of HNE, product of lipid peroxidation and important marker of oxidative stress, indicated that the aged animals have increased susceptibility to oxidative stress. Taken together our data suggests that systemic inflammation in aged animals increases susceptibility to cognitive impairment, oxidative stress, abnormal production of cytokines at peripheral and cerebral levels and microglial dysfunction.

Key words: aging, cognitive dysfunction, microglia, neuroinflammation, oxidative stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A epidemiologia do envelhecimento	1
1.2. Envelhecimento.....	2
1.3. Doenças mentais no envelhecimento	4
1.3.1 Formação da memória	4
1.4. Inflamação e conexões neuroimunológicas.....	7
1.4.1 Citocinas	10
1.5. Neuroinflamação.....	10
1.5.1. Astrócitos	12
1.5.2 Microglia.....	13
1.6. Estresse oxidativo.....	15
2. OBJETIVO.....	19
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais.....	20
3.2. Modelo experimental de inflamação sistêmica	20
3.2.1. Modelo agudo	20
3.2.2. Modelo crônico	20
3.3. Coleta de amostras.....	21
3.4. Avaliação da inflamação sistêmica.....	22
3.4.1. Análise do escore clínico	22
3.4.2. Contagem total e diferencial de leucócitos.....	23
3.4.3. Análise de citocinas	23
3.5. Avaliação comportamental	24
3.5.1. Teste de habituação em campo aberto	24
3.5.2. Teste de reconhecimento de objetos	25
3.5.3. Labirinto aquático de Morris.....	25
3.6. Imunohistoquímica	26
3.7. Quantificação da ativação de células gliais.....	26
3.8. Dosagem de proteínas pelo método BCA	27
3.9. Western Blotting	27
3.10. Quantificação da expressão de mRNA.....	28
3.10.1. Extração de RNA.....	28
3.10.2. Transcrição reversa do RNA (RT).....	28

3.10.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR)	29
3.11. Quantificação de lipofuscina	29
3.12. Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Acompanhamento da inflamação sistêmica no modelo experimental	30
4.1.2. Pesagem dos animais	30
4.1.2. Análise do escore clínico	30
4.1.3. Contagem total e diferencial de leucócitos.....	31
4.1.3. Análise de citocinas plasmáticas	34
4.2. Caracterização do déficit cognitivo após inflamação sistêmica crônica	35
4.2.1 Teste de habituação em campo aberto	35
4.2.2. Teste de reconhecimento de objetos	36
4.2.3. Labirinto aquático de Morris.....	37
4.3. Neuroinflamação.....	38
4.3.1 Ativação de astrócitos no hipocampo.....	38
4.3.2 Ativação de microglia no hipocampo.....	40
4.3.3. Análise de citocinas no tecido cerebral.....	42
4.4. Mecanismos moleculares do déficit cognitivo	44
4.4.1. Estresse oxidativo.....	44
4.4.2. Expressão de enzimas antioxidantes.....	45
4.4.3. Quantificação de agregados autofluorescentes	46
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	53
4. REFERÊNCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crianças e idosos, em porcentagem da população global: 1950-2050(Extraído de OMS, 2011)....	1
Figura 2. Variação percentual da população mundial por idade: 2010-2050 (Extraído de OMS, 2011).....	2
Figura 3. Diferença na capacidade funcional no envelhecimento (adaptado de Kalache e Kickbuch, 1997) 3	
Figura 4. Hipocampo. Estrutura interna do hipocampo.....	7
Figura 5. Morfologia microglial. Diferentes exemplos de morfologias da micróglia.	14
Figura 6. Fluxograma do desenho experimental.....	21
Figura 7. Modelo experimental	21
Figura 8. Escore Clínico.....	23
Figura 10. Desenho experimental da coleta do plasma.	24
Figura 11. Pesagem dos animais.....	30
Figura 12. Quantificação da gravidade dos sintomas clínicos após o desafio com LPS.	31
Figura 13. Contagem de células totais/diferenciais no modelo agudo.....	32
Figura 14. Contagem de células totais/diferenciais no modelo crônico.	33
Figura 15. Concentração de citocinas no sangue no modelo agudo.	34
Figura 16. Concentração de citocinas no sangue no modelo crônico.	35
Figura 17. Análise da atividade exploratória dos animais.	36
Figura 18. A inflamação sistêmica crônica afeta a memória de curta duração nos animais envelhecidos. .	37
Figura 19. Avaliação da memória espacial no labirinto aquático de Morris.	38
Figura 20. Fotomicrografia representativa da astrogliose no córtex frontal no estado basal e após o desafio inflamatório crônico.	40
Figura 21. Quantificação da astrogliose.	40
Figura 22. Fotomicrografia representativa das alterações morfológicas da microglia na região CA1 do hipocampo no estado basal e após o desafio inflamatório crônico.	41
Figura 23. Quantificação da ativação microglial no hipocampo.	42
Figura 24. Concentração de citocinas no cérebro em modelo agudo.	43
Figura 25 Concentração de citocinas no cérebro em modelo crônico.	44
Figura 26. Fotomicrografia representativa da expressão de HNE na região CA1 do hipocampo.	45
Figura 27. Quantificação do conteúdo de HNE no cérebro dos animais.	45
Figura 28. Expressão de RNAm das enzimas antioxidantes no cérebro.....	46
Figura 29. Fotomicrografias representativas da autofluorescência de lipofuscina no córtex cerebral dos camundongos envelhecidos.	47
Figura 30. Quantificação da autofluorescência de lipofuscina no córtex cerebral de camundongos envelhecidos.	47
Figura 31. Resumo das alterações das citocinas analisadas no presente trabalho.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	- Análise de variância (<i>Analysis of variance</i>)
AMPA	-Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
CAT	-Catalase
CD14	-Grupo de diferenciação (<i>Cluster of differentiation 14</i>)
CD68	- Grupo de diferenciação (<i>Cluster of differentiation 68</i>)
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico complementar (<i>complementary Deoxyribonucleic acid</i>)
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
DAMPs	- Padrões Moleculares Associado ao Dano (<i>Damage-associated molecular pattern</i>)
DNA	- Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DV	- Demência vascular
GABA	- Ácido Gama-aminobutírico
GFAP	- Proteína Ácida fibrilar Glial (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
HNE	-4-Hidroxi-nonenal
HMGB-1	-Proteína de alta mobilidade grupo 1 (<i>High mobility group box 1 protein</i>)
HPRT	-Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
IBA-1	- Molécula Adaptadora ligante de Cálcio Ionizado (<i>ionized calcium binding adapter molecule</i>)
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	- Interleucina
INF	- Interferon
kDA	-Kilo Dalton
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTP	-Potenciação de longa duração
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
NADPH	-nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato
NMDA	-N-metil D-aspartato
NOD	- Domínios de Oligomerização de Ligação de Nucleotídeos (<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>)
OMS	- Organização Mundial da Saúde (<i>world health Organization</i>)
PAMPs	- Padrões Moleculares Associados à Patógeno (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	- Tampão Fosfato-salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)

PKC	-Proteína quinase C
PMN	- Polimorfonuclear
PRR	- Receptores de Reconhecimento de Padrão (<i>Pattern recognition receptor</i>)
ROS	- Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
SNC	- Sistema Nervoso Central
SOD	- Superóxido Dismutase
TLR	- Receptores Semelhantes ao Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	- Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1. A epidemiologia do envelhecimento

O envelhecimento da população constitui uma das transformações demográficas mais importantes do século 21. Pela primeira vez na história, o número de pessoas com 65 anos ou mais irá superar o número de crianças abaixo de 5 anos de idade (figura 1). Em 2010, aproximadamente 524 milhões de pessoas tinham 65 anos ou mais, representando 8% da população mundial; em 2050, estima-se que estes dados se aproximarão de 1,5 bilhões, representando 16% da população mundial. A maior parte deste envelhecimento populacional está projetada para se concentrar em países menos desenvolvidos. Entre 2010 e 2050, espera-se que o número de pessoas idosas cresça mais de 250% nos países em desenvolvimento, enquanto que, em países desenvolvidos, a estimativa é de apenas 71% (OMS, 2011).

Até 2025, o Brasil será o sexto país do mundo com o maior número de pessoas idosas, segundo dados da OMS (2011). Em menos de 50 anos, o número de idosos no país passou de 3 milhões em 1960 para 20 milhões em 2008, um aumento de quase 700% (Veras, 2009). Estima-se que, em 2050, o número de pessoas no Brasil com 65 anos ou mais represente 22,71% da população total brasileira, ou seja, aproximadamente 50 milhões de pessoas (IBGE, 2009).

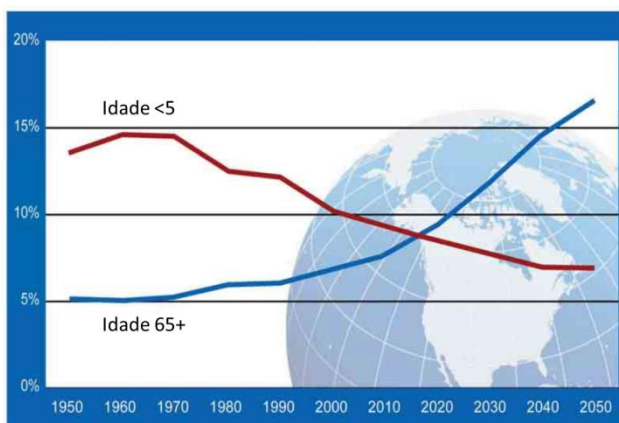


Figura 1. Crianças e idosos, em porcentagem da população global: 1950-2050(Extraído de OMS, 2011).

O aumento na expectativa de vida é uma das causas mais importantes para esse fenômeno: em 2050, espera-se que a expectativa de vida nos países desenvolvidos será de 87,5 anos para os homens e 92,5 para as mulheres (contra 70,6 e 78,4 anos em 1998). Já nos países em desenvolvimento, será de 82 anos para homens e 86 para mulheres, ou seja, 21 anos a mais do que os 62,1 e 65,2 atuais (Berquó, 2006). A Organização Mundial da Saúde (2011) prevê que, entre 2010 e 2050, o número de indivíduos centenários aumentará 10 vezes (figura 2).

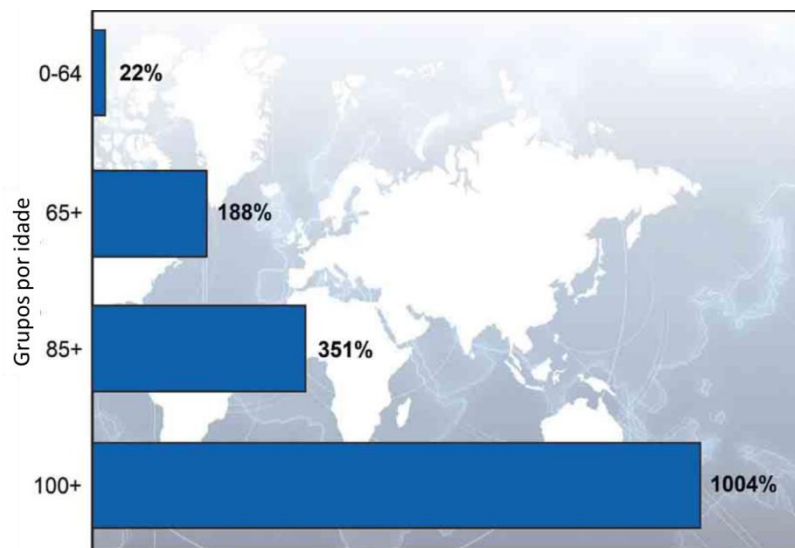


Figura 2. Variação percentual da população mundial por idade: 2010-2050 (Extraído de OMS, 2011)

Como consequência do envelhecimento populacional, o mundo tem experimentado uma transição epidemiológica, caracterizada pelo declínio das doenças agudas e aumento de casos de doenças crônicas. Durante os próximos 10 ou 15 anos, haverá mais mortes causadas por doenças crônicas, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, do que por doenças parasitárias e infecciosas (OMS, 2011). No Brasil, o índice de mortalidade causado por doenças infectocontagiosas chegou a cair de 40% para 10% em menos de 50 anos. O oposto ocorreu em relação às doenças cardiovasculares: em 1950, eram causa de 12% das mortes e, até o ano de 2000 representavam mais de 40% (IBGE, 2009).

Em 2008, aproximadamente 44% das mortes causadas por doenças crônicas ocorreram em pessoas com mais de 70 anos de idade. (OMS, 2011). Esse fato caracteriza um novo problema para as políticas públicas de saúde, uma vez que a demanda nos serviços nesse campo precisa se ajustar às necessidades do idoso, que necessita de cuidados constantes, medicação contínua e exames periódicos.

1.2. Envelhecimento

O envelhecimento é um processo biológico inevitável que está associado ao declínio fisiológico de funções orgânicas (OMS, 2004). As mudanças que ocorrem durante este processo não são lineares ou consistentes, pois durante o envelhecimento há um acúmulo gradual de danos celulares e moleculares ao acaso. O ritmo e o efeito do envelhecimento estão relacionados a diferenças individuais dependentes de eventos de natureza genética, sócio-histórica e psicológica (Neri, 2005).

O envelhecimento pode ser considerado fisiológico (senescência) quando há presença de transformações orgânicas, morfológicas e funcionais, mas não há ocorrência de problemas infecciosos ou psicológicos. Uma das principais transformações deste processo é a presença de um estado de inflamação crônica de baixa intensidade (*inflammaging*). O envelhecimento patológico (senilidade) é um processo em que há presença de doenças crônicas ou outras alterações biológicas ou psicológicas que interferem na saúde e independência do idoso (Cidrack, 2004) (figura 3). As doenças incapacitantes que ocorrem nos idosos geralmente cursam de forma crônica e, segundo a OMS, já representam mais de 87% dos casos de doenças na população de 60 anos ou mais (2011).

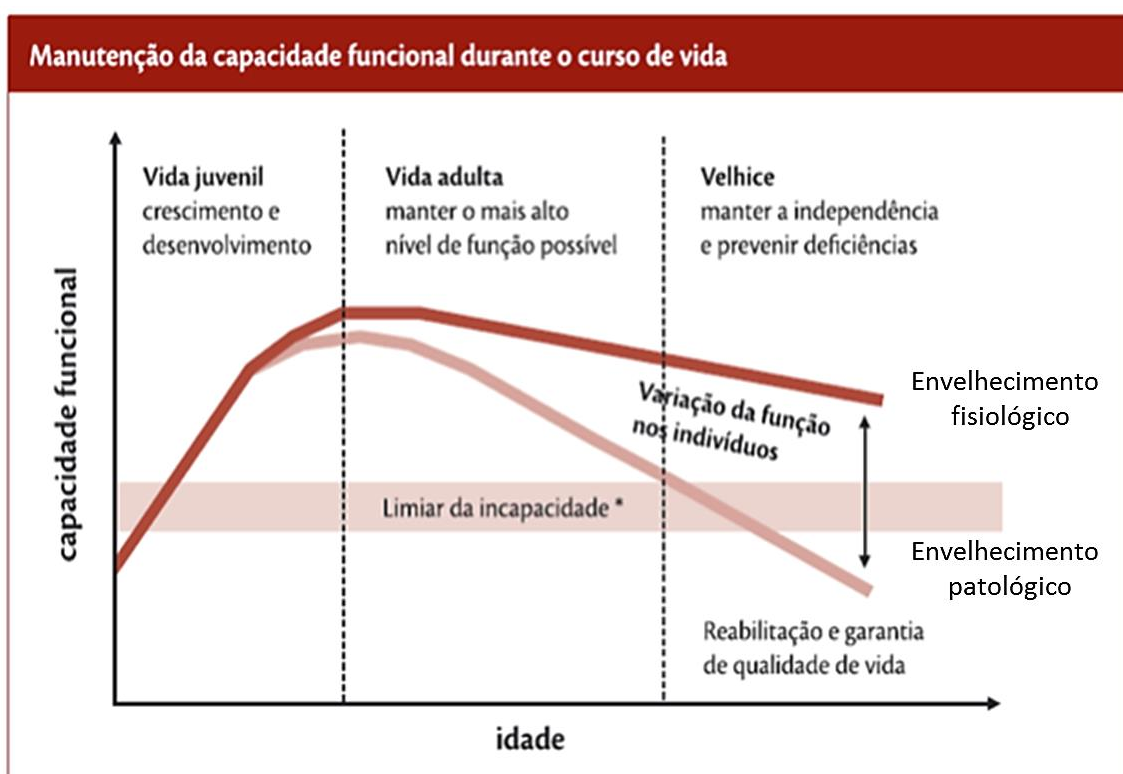


Figura 3. Diferença na capacidade funcional no envelhecimento (adaptado de Kalache e Kickbuch, 1997)

As doenças crônicas são definidas como condições de longo prazo que são manifestadas pelas interações entre fatores genéticos e fatores ambientais externos (Hui, 2015). As principais doenças crônicas que afetam os idosos são doenças cardiovasculares, hipertensão, derrame, diabetes, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite, osteoporose e doenças mentais como depressão e demência (OPS, 2005).

O envelhecimento é geralmente associado a um declínio gradual das funções cognitivas, especialmente no processamento de informações e memória, o que pode acarretar uma diminuição na qualidade de vida de um idoso (Salthouse, 2010). Portanto, o estudo dos

mecanismos responsáveis pelas alterações comportamentais e a identificação precoce de alterações moleculares relacionadas a estas têm sido cada vez mais importante para a compreensão das bases biológicas relacionadas ao envelhecimento e ao declínio cognitivo.

1.3. Doenças mentais no envelhecimento

O maior fator de risco para o declínio cognitivo nos indivíduos é a idade. Durante o processo de envelhecimento ocorrem diversas alterações no indivíduo que podem interferir de forma macro e microscópica no encéfalo. Tais alterações no sistema nervoso central (SNC) podem se manifestar como disfunções comportamentais que podem, a longo prazo, evoluir para demência.

A demência é uma das principais causas de incapacidade na velhice, gerando um grande impacto na independência do idoso. O total de pessoas com demência no mundo foi estimado em 35,6 milhões em 2010, e projeta-se que estes números dupliquem a cada 20 anos, se aproximando de 65,7 milhões de casos em 2030 e 115,4 milhões de casos em 2050. O número total de casos de demência no mundo por ano é de aproximadamente 7,7 milhões, o que significa um novo caso diagnosticado a cada 4 segundos. No Brasil foi estimado que, em 2010, aproximadamente um milhão de pessoas conviviam com a demência. O Brasil é o nono país do mundo em números de casos de demência (OMS, 2006).

As mudanças no encéfalo durante a demência incluem a redução no peso e no volume do órgão, o aspecto dos giros e sulcos, o volume dos ventrículos, o tamanho e o número dos neurônios, a diminuição na extensão das ramificações dendríticas, a diminuição do número de espinhas dendríticas e de sinapses, o acúmulo do pigmento lipofuscina, o aparecimento de placas senis e os enovelamentos ou emaranhados neurofibrilares (Mattson, 2003; Scahill *et al.*, 2003). Existem vários subtipos etiológicos de demência, onde se incluem doenças neurodegenerativas (como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson) e doenças vasculares (como a demência vascular) (Laxton e Lozano, 2013). Esta síndrome de natureza crônica e progressiva causa perturbação de múltiplas funções corticais superiores como formação de memória, orientação, capacidade de aprendizagem e julgamento (OMS, 2012).

1.3.1 Formação da memória

A memória pode ser descrita como a capacidade de armazenar e evocar informações através dos processos de aquisição e armazenamento/consolidação. A aquisição refere-se ao período de tempo entre a percepção de estímulos provenientes de uma experiência e o momentos que esses estímulos são codificados em uma forma de memória particular. A

atenção é um fator decisivo durante essa fase (Hamann, 2001; Kentros *et al.*, 2004). A consolidação é o processo pelo qual uma informação adquirida é estabilizada para ser armazenada como memória de longa duração. Esse processo é vulnerável a interferências farmacológicas ou comportamentais (Glaser *et al.*, 2010; Squire *et al.*, 2015). Durante a dita consolidação celular da memória, ocorre uma série de processos metabólicos em diferentes estruturas encefálicas associadas ao armazenamento da memória. A duração de tal processo, entretanto, depende da estrutura cerebral envolvida (Izquierdo e Medina, 1997). O tempo transcorrido entre a aquisição e o armazenamento é chamado de janela de consolidação, e é o momento onde pode-se fazer o maior número de análises sobre os mecanismos de formação da memória, além de intervir sobre a mesma (Wallenstein *et al.*, 2002; Berlese *et al.*, 2005; Fulton *et al.*, 2005). A evocação é o último processo da memória, é rotineiramente chamado de lembrança.

O processo de consolidação das memórias passa por um evento conhecido como potenciação de longa duração (LTP). Nesse processo, ocorre uma alteração da eficiência sináptica em resposta à estimulação (McGaugh, J.L. 2000). A produção da LTP *in vitro* utiliza processos bioquímicos semelhantes àqueles utilizados para a consolidação das memórias (Clarke *et al.*, 2010).

A memória pode ser classificada de acordo com a sua duração ou seu conteúdo. Se tratando de tempo, as informações que estão disponíveis por um período curto de tempo (segundos ou minutos) são classificadas como memória de trabalho. Esta compreende um sistema de controle de atenção (executivo central), auxiliado por dois sistemas de suporte (de natureza visuo-espacial e outro de natureza fonológica) que ajudam no armazenamento temporário e na manipulação das informações. O executivo central tem sua atividade relacionada ao funcionamento do lobo frontal e do cerebelo. O sistema de suporte visuo-espacial tem um componente visual, relacionado à região occipital e um componente espacial, relacionado a regiões do lobo parietal. Já no sistema fonológico, a articulação subvocal auxilia na manutenção da informação. As memórias que são armazenadas por um tempo maior que a memória de trabalho, mas ainda por um tempo curto (minutos ou algumas horas), são chamadas de memórias de curta duração. Ela envolve estruturas como o hipocampo, a amígdala, o córtex entorrinal e o giro para-hipocampal, sendo depois transferida para as áreas de associação do neocórtex parietal e temporal. A memória que está disponível durante mais tempo (dias ou anos) é chamada de memória de longa duração, esta leva tempo para ser consolidada, e é suscetível a numerosos fatores nas primeiras horas após sua aquisição (Mcgaugh, 1966; Izquierdo, 1989; Mcgaugh, 2000). Segundo Lombroso (2004), para a

formação de memória de longo prazo é necessária modificação estrutural e funcional nos neurônios. Alterações morfológicas nas sinapses devem ocorrer permitindo a formação de novas sinapses e fortalecimento das antigas. Uma série de eventos intracelulares é necessária para que ocorram as modificações estruturais nas sinapses requeridas para o aprendizado, como liberação de neurotransmissores e formação de proteínas (Lombroso, 2004).

Em termos de conteúdo, pode-se classificar as memórias em: declarativa e não-declarativas. As memórias não-declarativas está relacionada a habilidades e hábitos, como a memória de procedimentos, que é a memória de atos motores ou de concatenações de atos motores. Esta tem uma localização cortical em parte, pelo menos inicialmente, mas depois envolve os gânglios basais e o cerebelo. É a chamada memória procedural, avaliada geralmente por meio de demonstrações, e geralmente não precisa de evocação consciente (Nadel *et al.*, 2000). A memória declarativa é conscientemente evocada, é a memória de fatos, de eventos, de pessoas, de faces, de conceitos, de ideias. Estas se formam inicialmente em uma região do lobo temporal, o hipocampo. A informação que irá converter-se eventualmente em memórias no hipocampo entra pelo córtex entorrinal, que recebe fibras de todas as vias sensoriais, de praticamente todo o córtex (Izquierdo, 1989).

A variedade de memórias possíveis é tão grande que é evidente que a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações é inerente a muitas áreas ou subsistemas cerebrais, e não é função exclusiva de nenhuma delas. Os mecanismos que selecionam as informações que serão eventualmente armazenadas também são diversos, e envolvem processos no hipocampo e na amígdala. A lesão bilateral destas duas estruturas do lóbulo temporal não causa a perda de memórias existentes, com a exceção daquelas mais recentes, que ainda não foram adequadamente consolidadas. Entretanto, ela impede a aquisição de novas memórias declarativas (Schutz e Izquierdo, 1979; Markowitsch e Pritzel, 1985). O hipocampo recebe projeções das diversas vias sensoriais através de vias secundárias originadas na formação reticular mesencefálica, septo, amígdala, e córtex. (Green, 1964).

O hipocampo possui um circuito funcional que representa o sistema hipocampal (figura 4) onde elementos como o giro dentado, CA1 e o CA3 são capazes de evidenciar plasticidade (Izquierdo e Medina, 1997).

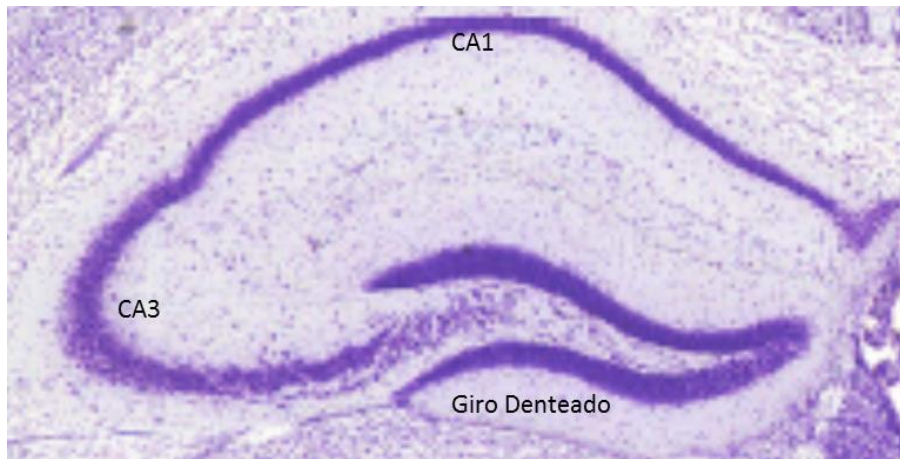


Figura 4. Hipocampo. Estrutura interna do hipocampo.

Evidências recentes sugerem que o hipocampo é especializado, de fato, no reconhecimento de ambientes, mais do que no reconhecimento de qualquer estímulo (O'keefe, 1978). É provável que o reconhecimento da novidade ou não de determinadas ou de todas as situações em geral, por parte do hipocampo, envolva, primariamente, o reconhecimento do contexto espacial de cada estímulo ou de uma configuração de estímulos em particular (O'keefe, 1978).

A formação da memória ocorre com o desencadeamento de diversos fatores como a plasticidade sináptica, que refere-se a eventos que levam a mudanças na força sináptica. Classicamente, a plasticidade sináptica no hipocampo se inicia com a ativação dos receptores do glutamato do tipo AMPA e do tipo NMDA. Uma vez que o receptor NMDA é ativado, ocorre uma mobilização de cálcio para o meio intracelular, que leva à ativação de diversas proteínas quinases como as proteínas cálcio dependentes (PKC). Vias de fatores de transcrição são ativadas o que leva à síntese e liberação de glutamato e aumento da expressão de seus receptores (Izquierdo e Medina, 1997).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações neurológicas durante o envelhecimento ainda não são bem compreendidos. Evidências clínicas e experimentais sugerem que infecções recorrentes ou doenças inflamatórias crônicas podem acelerar o declínio cognitivo associado a doenças neurodegenerativas e ao envelhecimento (Perry *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2015).

1.4. Inflamação e conexões neuroimunológicas

O processo inflamatório consiste na resposta orgânica diante de lesão tecidual ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico

e o tecido no qual ocorreu à lesão. A resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência, tentando proteger o organismo de estímulos nocivos.

A resposta inflamatória se inicia através do sistema imune inato, que é composto por células efetoras e de resolução como macrófagos, mastócitos, fibroblastos, células dendríticas, células endoteliais, monócitos e neutrófilos. Estas células possuem receptores expressos em sua superfície chamados receptores de reconhecimento de padrões moleculares (*pattern recognition receptors*, PRRs) que são capazes de reconhecer estruturas moleculares características de microorganismos ou de lesão celular e estimular a imunidade inata a agir diretamente contra os agentes estressores ou infecciosos através da fagocitose, liberação de citocinas e moléculas coestimuladoras do sistema imune adaptativo. Os receptores da família Toll (*toll-like receptors*, TLR) e os receptores do tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), domínios de oligomerização de ligação de nucleotídeos) são exemplos de PRRs e moléculas como lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicoico, HMGB-1, DNA mitocondrial, heme, etc, são exemplos de estruturas que estimulam a imunidade inata e são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) e padrões moleculares associados ao dano tecidual (*Damage-associated molecular pattern*, DAMP) (Medzhitov e Janeway, 2000; Hansen *et al.*, 2011).

O processo inflamatório é composto de três fases, cada qual mediada por diferentes mecanismos: uma fase aguda, caracterizada pela curta duração e apresentação dos sinais cardinais que são a dor, calor, rubor, edema e a perda da função; uma fase tardia, que pode perdurar por tempo indeterminado, caracterizada pela infiltração de leucócitos e células fagocitárias; e uma fase proliferativa crônica, na qual ocorre regeneração tecidual e fibrose. Quando o processo é bem sucedido, ocorre a resolução da inflamação, atingindo o seu objetivo de conter, diluir e destruir o agente agressor. Neste caso o edema e as proteínas são drenados pelos vasos linfáticos. Depois disso o tecido inflamado volta ao normal (GILMAN *et al.*, 2006).

A resolução do processo inflamatório agudo é um processo ativo e altamente coordenado, controlado por diferentes vias bioquímicas que são ativadas e que produzem diversos mediadores lipídicos, os quais apresentam características pró-resolução (GILROY *et al.*, 2004). Estes mediadores lipídicos possuem, dentre outras propriedades, a capacidade de inibir a migração de leucócitos para o local inflamado, são capazes de reverter a permeabilidade vascular e a vasodilatação, e promover a remoção de neutrófilos apoptóticos

sem que ocorra a produção e liberação adicional de mediadores pró-inflamatórios (WILLOUGHBY et al., 2000; SERHAN et al., 2007; BANNENBERG e SERHAN, 2010).

Durante o envelhecimento, ocorrem alterações celulares que acarretam em mudanças no sistema imunológico do idoso, que pode se tornar menos funcional. Tais alterações induzem um estado de inflamação crônica no indivíduo, também conhecido como *inflammaging*. As características do *inflammaging* diferem dos tradicionais cinco sinais cardinais da inflamação aguda, já que o fenômeno é de baixa intensidade, controlado, assintomático, crônico e sistêmico (Giunta, 2006). Este processo é evidenciado pelo aumento sérico nos níveis de citocinas como IL-6, TNF- α e IL-1 β (Bruunsgaard et al., 1999; Bruunsgaard e Pedersen, 1999; Michaud et al., 2013). Os mecanismos em torno desse aumento basal da inflamação associado à idade não são completamente entendidos; porém, envolvem mudanças no número e na função das células do sistema imune inato, além de alteração na expressão e sinalização dos receptores de reconhecimento padrão (*Pattern recognition receptor*, PRRs) que induzem a secreção de citocinas (Shaw et al., 2013). Acredita-se que o estado de *inflammaging* pode contribuir para o aparecimento de doenças associadas ao envelhecimento (Campisi e Robert, 2014; Franceschi e Campisi, 2014).

A resposta inflamatória sistêmica se propaga para o SNC por diferentes vias. Uma das vias é neural, e envolve a ativação do nervo vago aferente, que funciona como um sensor visceral da inflamação durante infecções abdominais e viscerais (Mravec, 2010; Janig e Green, 2014). O nervo vago possui receptores de citocinas e de padrões moleculares em seu axônio que se projeta para os núcleos da base do cérebro. Outra via é humoral, através dos órgãos circunventriculares e o plexo coroide, sítios desprovidos de barreira hemato-encefálica que expressam constitutivamente proteínas importantes no reconhecimento de patógenos como TLR, CD14 e receptores de citocinas pró-inflamatórias. O plexo coroide consiste de um tapete de capilares que cobre as células ependimais dos ventrículos. Estas células são responsáveis pela produção do líquido. A ativação de TLRs presentes nos órgãos circunventriculares induz a produção e liberação de citocinas no sistema nervoso central (Tracey, 2002; Czura e Tracey, 2005). Além das vias clássicas, foi recentemente descoberto que o SNC possui sistema linfático: os vasos são encontrados nos seios duros próximo a grandes vasos sanguíneos e são responsáveis por transportar as células imunológicas (Louveau et al., 2015). A propagação destas vias de sinalização para o cérebro leva à ativação da microglia e à secreção de citocinas pró-inflamatórias no parênquima cerebral. Além das observações clínicas, estudos em modelos animais mostram que existe uma conexão entre a produção de citocinas no SNC e o comportamento associado à doença e à depressão (Dantzer et al., 2008).

1.4.1 Citocinas

As citocinas compreendem um grupo de pequenos polipeptídeos (8-30 kDa) que foram originalmente caracterizados como imunomoduladores e que possuem diversas funções em diferentes tecidos. Com base em sua estrutura molecular e ações fisiológicas, as citocinas são divididas em interleucinas (IL), interferons (IFN), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas e fatores de crescimento (Rosenbaum *et al.*, 1998).

No SNC, estas moléculas estão envolvidas na modulação de diversas funções e disfunções neurológicas. As citocinas contribuem para a defesa do SNC e o reparo tecidual, controlam a atividade sináptica e regulam positivamente os circuitos neuronais promovendo à LTP (Viviani *et al.*, 2004; Viviani *et al.*, 2007).

O sistema imune periférico pode influenciar o SNC através da síntese de citocinas, gerando uma série de alterações comportamentais conhecidas como “comportamento de doença” (*sickness behaviour*): dentre elas, a redução de ingestão de alimentos, a diminuição da interação social, e alterações no humor e na cognição (Dantzer *et al.*, 2008). Estas citocinas produzidas no sistema periférico entram no SNC através da difusão passiva ou são ativamente transportadas através da barreira hematoencefálica (Banks *et al.*, 2001; Banks, 2006). A produção local de citocinas no SNC é derivada dos astrócitos e microglia e pode ocorrer de forma exacerbada após a ativação destas células em resposta a estímulos.

No envelhecimento, o balanço homeostático entre mediadores proinflamatórios e anti-inflamatórios encontra-se em desequilíbrio. A desregulação das citocinas em prol de um estado proinflamatório está relacionado a efeitos prejudiciais que podem resultar em neurotoxicidade (Viviani *et al.*, 2004; Lynch, 2010).

1.5. Neuroinflamação

Processos inflamatórios podem ocorrer no SNC em resposta a estímulos patogênicos, isquêmicos ou traumático-hemorragicos, através de mediadores inflamatórios como citocinas, alarminas e componentes de bactérias, fungos e outros agentes infecciosos (Diener *et al.*, 2013). Esta resposta inflamatória no SNC é conhecida como neuroinflamação e é caracterizada pela ativação das células gliais, como astrócitos e microglia (Kreutzberg, 1996; Streit *et al.*, 1999), pelo aumento da concentração de diferentes citocinas e quimiocinas e, em certas condições mais graves, disfunção ou quebra da barreira hematoencefálica (Lossinsky e Shivers, 2004).

A função do SNC depende de circuitos neurais precisos que integram regiões cerebrais com funções especializadas. Portanto, dependendo da região cerebral, determinadas lesões podem inativar vias neurais específicas, gerando déficits cognitivos e/ou motores, como o comprometimento de neurônios hipocâmpais causando perda de memória na doença de Alzheimer, e a degeneração de neurônios da *substantia nigra* causando déficits motores na doença de Parkinson (Mattson e Magnus, 2006).

Devido à variedade de natureza, severidade e local da lesão, a resolução do processo inflamatório nem sempre é possível, e a persistência da resposta pode ocasionar uma progressão na inflamação, que pode passar de aguda para crônica (Bajramovic, 2011). A neuroinflamação aguda é uma resposta do SNC a infecção ou injúria tecidual, que causa alterações metabólicas e comportamentais. A manifestação neurológica da inflamação sistêmica é conhecida como delirium, síndrome de natureza aguda e transiente causada por alterações nas funções corticais. É mais frequente em pessoas idosas, principalmente naquelas com demências, déficits sensoriais, déficits funcionais e múltiplas comorbidades. Representa uma emergência médica e os sintomas incluem alterações da consciência e distúrbios de atenção e concentração (Perry *et al.*, 2007). A neuroinflamação crônica é uma resposta prolongada no SNC devido à persistente presença do estímulo lesivo ao tecido, e à autopropagação da resposta de ativação microglial (Streit, 2004).

Apesar da diferença em sua apresentação clínica, a neuroinflamação tem sido identificada como um processo crucial para a progressão de muitas doenças neurodegenerativas (Choi *et al.*, 2007), pois a ativação crônica das células gliais contribui para disfunção, lesão e morte neuronal (Streit, 2004) devido à secreção de produtos tóxicos como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico (NO), enzimas proteolíticas, fatores do sistema complemento e aminoácidos excitatórios (Halliday *et al.*, 2000).

Além de neurônios, o SNC possui células gliais que contribuem de diversas formas para a sustentação da homeostase tecidual e para a neuroinflamação. As células gliais podem ser divididas, principalmente, em três diferentes classes: os oligodendrócitos, que estão presentes na substância branca e formam a bainha de mielina em torno dos axônios (Pfeiffer *et al.*, 1993); a microglia, caracterizada por monitorar o ambiente externo, respondendo aos sinais de desequilíbrio na homeostase (Kreutzberg, 1996) e os astrócitos, que participam de todas as funções essenciais do SNC, como metabolismo energético, defesa imunológica e neurotransmissão (Oberheim *et al.*, 2012).

1.5.1. Astrócitos

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes do SNC, e representam 25% do volume total do cérebro humano (Guillamon-Vivancos *et al.*, 2015). Diferentemente das células da microglia, que possuem origem mesodermal, os astrócitos têm origem ectodérmica e podem ser classificados em duas subpopulações com base em sua morfologia e localização (Kimelberg, 1983). Os astrócitos protoplasmáticos estão presentes na substância cinzenta cerebral e possuem processos de ramificação menos pronunciados, enquanto que os astrócitos fibrosos são encontrados na substância branca e contém longas fibras finas e ramificadas (Miller e Raff, 1984). Entre as características gerais dos astrócitos, destaca-se a presença de prolongamentos com filamentos intermediários cujo componente principal é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), clássico marcador de ativação deste tipo celular e que faz parte de uma família de proteínas de citoesqueleto que também inclui vimentina, nestina e outros (Eng, 1985).

Os astrócitos desempenham uma série de funções essenciais para a homeostase do SNC, incluindo manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, alterados com a descarga de potenciais de ação dos neurônios; captação e liberação de neurotransmissores, com papel crítico no metabolismo de glutamato e GABA; participação na formação da barreira hematoencefálica; secreção de fatores tróficos essenciais para sobrevivência e diferenciação dos neurônios; direcionamento de axônios e funcionamento das sinapses (Nones *et al.*, 2010; Stipursky *et al.*, 2012); regulação no fluxo sanguíneo e suporte metabólico para os neurônios (Magistretti, 2011).

Evidências sugerem que os astrócitos também possuem papel na defesa imunológica. Diversos estudos recentes mostram que há nestas células expressão de receptores TLR4, TLR3, além de receptores de manose e fatores do sistema complemento (Farina *et al.*, 2007). Em várias patologias do SNC, os astrócitos reagem prontamente à lesão, levando à astrogliose (Guo *et al.*, 2007). A astrogliose é um processo caracterizado pelo aumento dos filamentos intermediários, hipertrofia celular e aumento anormal do número de células. Quando ativados, os astrócitos sintetizam uma variedade de fatores tróficos, citocinas e componentes da matriz extracelular (Eddleston e Mucke, 1993). Ao longo do tempo, no entanto, a astrogliose pode se tornar prejudicial, secretando substâncias neurotóxicas excessivas e dificultando a recuperação funcional (Zhang *et al.*, 2010).

A astrogliose está associada ao aparecimento e duração do dano celular neuronal na região do cérebro afetada. Acredita-se que ela é um componente de diversas neuropatologias

como epilepsia (Miyazaki *et al.*, 2003), acidente vascular cerebral (Hayakawa *et al.*, 1979), isquemia cerebral (Zhu *et al.*, 2007), esclerose múltipla (Lycke *et al.*, 1998) e esclerose lateral amiotrófica (Ferri *et al.*, 2004).

1.5.2 Microglia

Descrita inicialmente por Pío Del Río Hortega em 1932, a microglia é considerada um dos principais sistemas de defesa do SNC, e se distribui por todo o tecido cerebral chegando a representar, em humanos, 16% de toda a população celular cerebral (Norden e Godbout, 2013). Também conhecidas como macrófagos residentes do SNC, estas células têm origem mieloide e migram para o SNC durante o desenvolvimento embrionário (Del RIO-HORTEGA, 1932) e provavelmente também durante o curso da vida, principalmente após injúria e trauma (Graeber e Streit, 2010).

A microglia possui morfologia distinta, quando comparada com macrófagos de outros tecidos. O seu formato típico, no estado inativado, é bem ramificado, com muitos prolongamentos; porém, durante situações de injúria tecidual, estas células se ativam e tornam-se hipertróficas, com aumento do volume do corpo celular e diminuição dos prolongamentos (Figura 5). No seu grau máximo de ativação apresentam morfologia ameboide, arredondada com prolongamentos grossos e menos numerosos. Há também descritos na literatura outros tipos morfológicos de microglia: as que apresentam forma de bastão, com núcleo alongado, citoplasma escasso e poucos prolongamentos, mais comuns em doenças crônicas, e a morfologia distrófica, que é caracterizada por ter corpo celular alargado, perda de ramificação e produção de esferoides citoplasmáticos; foi sugerido que a morfologia distrófica é característica da microglia disfuncional associada ao envelhecimento (Streit, 2006).

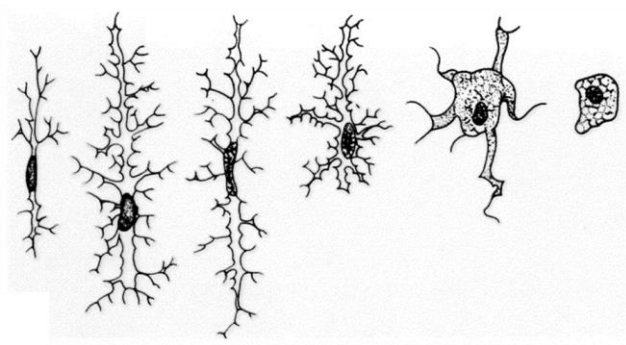


Figura 5. Morfologia microglial. Diferentes exemplos de morfologias da micróglia.

Durante a homeostase, a microglia possui funções essenciais, como monitoramento de sinapses (Wake *et al.*, 2009), limpeza de células apoptóticas e restos celulares (Sierra *et al.*, 2010) e também estão envolvidas na poda sináptica (*synaptic pruning*) (Paolicelli *et al.*, 2011). A sua morfologia, em homeostase, se apresenta ramificada com longos e finos processos com alta motilidade. A contínua mobilidade garante que a microglia possa detectar e responder rapidamente a distúrbios na homeostase (Davalos *et al.*, 2005). A ativação da microglia, em situações patológicas, resulta em migração para o local da lesão, processamento e apresentação de antígenos, produção de fatores citotóxicos e neurotróficos (Dheen *et al.*, 2007) e fagocitose de substâncias indesejadas (Farfara *et al.*, 2008). A microglia é a principal célula fagocítica do SNC, e possui a capacidade de fagocitar células vivas, como neurônios (Neher *et al.*, 2013), progenitores neuronais (Hoeppner *et al.*, 2001), neutrófilos (Neumann *et al.*, 2008) e gliomas (Kopatz *et al.*, 2013) em horas. A fagocitose de neurônios viáveis requer sinais específicos (*eat-me signals*) que estão aumentados em situações de estresse. Estudos mostram que a estimulação da microglia com ligantes de TLR *in vitro*, prejudica sua capacidade de discriminar neurônios viáveis de inviáveis (Neher *et al.*, 2013).

Diversos receptores de superfície de membrana são capazes de modular a resposta da microglia ao microambiente. Citocinas próinflamatórias e glutamato, por exemplo, podem causar uma ativação citotóxica que gera destruição de sinapses e dendrito, enquanto outros sinais, atuando através de moléculas de supressão imunológica, como fractalquina, podem alternar a ativação para um estado reparador (Blaylock, 2013).

A definição dos tipos de ativação destas células foi baseada inicialmente em macrófagos periféricos caracterizados por experiências *in vitro* e confirmado em roedores. O estado de ativação destas células pode ser classificado em dois subtipos: classicamente ativado (subtipo M1) e alternativamente ativado (subtipo M2) (Saijo e Glass, 2011). Evidências recentes sugerem que o mesmo macrófago periférico tem o potencial de adotar fenótipos M1 ou M2 baseado no tipo de estímulo (envelhecimento, lesão ou doença crônica) ou sobre o estado inicial da célula antes do estímulo (Mosser e Edwards, 2008). O fenótipo M1 está primariamente associado a uma elevada expressão de níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e com a indução de neurodegeneração, enquanto que o fenótipo M2 pode estar relacionado ao reparo tecidual ou a um estado de regulação, com produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF β e IL-10 (Boche *et al.*, 2013).

Apesar de a microglia ter papel protetor do cérebro contra estímulos nocivos ao SNC durante todo o curso de vida, a eficácia das suas funções aparenta se deteriorar com o avanço da idade. Os efeitos do envelhecimento podem estar associados à perda de função e também a respostas de hiper-reatividade microglial (Franceschi *et al.*, 2000). A hiper-reatividade microglial foi observada em um modelo murino de doença de príon, onde, após a administração de LPS, estas células secretavam mais IL-1beta e causavam a aceleração da neurodegeneração (Combrinck *et al.*, 2002). Baseado nestas observações, o conceito de microglia pré-ativada foi introduzido por Perry (Perry *et al.*, 2003; Perry, 2004). Morfologicamente, a microglia pré-ativada é caracterizada por se apresentar de forma parecida a uma micróglia ativada; porém, estas células não são capazes de secretar moléculas pró-inflamatórias. Em um estímulo inflamatório sistêmico, a micróglia induz uma resposta inflamatória mais rápida e maior, em comparação a uma micróglia não primada. Outras características da microglia relacionadas à idade incluem: senescência replicativa associada ao encurtamento dos telômeros (Flanary *et al.*, 2007); motilidade diminuída, que resulta em diminuição da vigilância imunológica (Damani *et al.*, 2011); aumento da expressão de marcadores inflamatórios como MHC II (complexo principal de histocompatibilidade classe II), CD68, CD11b/CR3, CD14 e receptores de reconhecimento padrões moleculares (Hart *et al.*, 2012); possível deficiência no processo de fagocitose (Tremblay *et al.*, 2010) e perda de homeostase proteica (proteostase) associada a doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington (Taylor e Dillin, 2011).

1.6. Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, são um grupo de moléculas reativas de origem predominantemente endógena, derivadas da redução incompleta do oxigênio. Embora existam fontes exógenas como radiação, cigarro e solventes orgânicos, a principal fonte de ROS é o próprio metabolismo celular, através da atividade de peroxissomos, xantina oxidase, citocromos p450, NADPH oxidases e mitocôndria (Giustarini *et al.*, 2009).

Em condições fisiológicas, ROS funcionam como importantes sinalizadores intracelulares e, em concentrações baixas, são essenciais para a regulação da autofagia, modulação da resposta imune, proliferação celular e indução adequada da plasticidade sináptica e formação de memória. Porém, em altas concentrações, as ROS possuem efeito prejudicial à integridade estrutural e funcional da célula (Oktyabrsky e Smirnova, 2007; Massaad e Klann, 2011).

Devido à instabilidade e potencial citotóxico das ROS, existem no organismo uma série de mecanismos antioxidantes que protegem os tecidos do dano oxidativo. Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, vitamina E, vitamina C e glutathione neutralizam os radicais livres, diminuindo seus efeitos deletérios. O desequilíbrio entre este sistema antioxidante celular e a concentração de ROS é definido como estresse oxidativo (Krinsky, 1992).

Praticamente todas as células aeróbicas enfrentam a ameaça do estresse oxidativo. Entre os tecidos humanos, o cérebro é especialmente sensível ao dano oxidativo, devido ao seu elevado consumo de O₂. Em seres humanos adultos, o cérebro representa apenas uma pequena percentagem do peso corporal, mas consome cerca de 20% do O₂ basal (Verweij *et al.*, 2007).

A progressiva desregulação do metabolismo celular ocasiona alterações nos mecanismos de neutralização de ROS, acarretando em aumento de sua concentração. Este aumento na produção de ROS contribui para o processo de envelhecimento, através de modificações oxidativas de macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA. As principais fontes endógenas de ROS são a mitocôndria e a NADPH oxidase (Sastre *et al.*, 2000; Poulsen, 2005).

A formação de ROS pela mitocôndria ocorre durante a respiração celular, na cadeia transportadora de elétrons, onde são formados o ânion superóxido e posteriormente o peróxido de hidrogênio por ação da SOD. O peróxido de hidrogênio é então transformado em oxigênio e água por ação da catalase (CAT). Alterações na função da SOD e / ou CAT podem acarretar o aumento da produção de ânion superóxido e conseqüentemente estresse oxidativo e dano celular. Estudos têm demonstrado que disfunções mitocondriais, tanto metabólicas quanto estruturais, são um fator importante na patogênese de doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Hirai *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2006).

As NADPH oxidases são complexos multiproteicos transmembranares, ativadas durante o processo inflamatório, cuja função é gerar ROS através da transferência de elétrons de um doador NADPH para o oxigênio molecular durante o processo inflamatório, formando o ânion superóxido. Estas enzimas estão presentes em células fagocíticas como a microglia e são compostas por seis subunidades: duas proteínas transmembranares (gp91phox, p22phox), três proteínas citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox) e uma GTPase. Em células não-fagocíticas, são encontrados homólogos da subunidade gp91phox (Nox1, Nox3, Nox4 e

Nox5) com diferenças significantes na estrutura, preferencia por substratos e tempo de atividade (Bedard e Krause, 2007).

Através da SOD, ocorre a produção de peróxido de hidrogênio a partir do ânion superóxido e os efeitos de ambas moléculas estão relacionadas à sua capacidade de reagir com outros produtos, de modo a gerar outras ROS, tais como o radical hidroxila. O ânion superóxido também pode reagir com o óxido nítrico, molécula derivada de mediadores inflamatórios, levando à formação de peróxido de nitrito, um poderoso oxidante que pode formar radical hidroxila e gerar peroxidação lipídica (Beckman *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1992).

A peroxidação lipídica é uma das principais fontes de lesão celular mediada por ROS, que desregula a estrutura e a função normal da bicamada lipídica, danificando diretamente a membrana e gerando inúmeros produtos secundários como o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), importantes marcadores do dano oxidativo (Loidl-Stahlhofen *et al.*, 1994; Catala, 2011).

O estresse oxidativo precoce é um mecanismo de lesão tecidual comum entre diferentes doenças inflamatórias e infecciosas agudas que afetam o cérebro. Dados do nosso grupo e de outros grupos mostram que o controle do estresse oxidativo na fase aguda de infecções graves como sepse e malária cerebral previne o aparecimento de déficits cognitivos posteriores (Barichello *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2012; Hernandez *et al.*, 2014).

Acredita-se que a formação de ROS e o dano oxidativo estão envolvidos na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas. Marcadores de estresse oxidativo, como proteínas carboniladas, nitrotirosina, produtos de peroxidação lipídica e de bases de DNA oxidadas, foram detectados em concentrações aumentadas em tecidos cerebrais de pacientes e em modelos animais de várias doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington (Butterfield *et al.*, 2010; Ruiperez *et al.*, 2010).

Além da peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas é relatada em muitos estudos sobre envelhecimento como contribuinte para a inibição ou danificação de múltiplas enzimas, afetando funções celulares como síntese de proteínas, metabolismo energético e dinâmica do citoesqueleto. Em adição a estas alterações, a oxidação de proteínas pode contribuir para a formação de agregados proteicos intracelulares que podem ter efeitos adicionais na homeostasia celular. As duas principais vias proteolíticas que medeiam a função de combate à

formação destes agregados são a via lisossomal e proteassomal. Durante o envelhecimento estas vias podem estar alteradas e a proteólise pode se tornar ineficaz e acúmulo de agregados lipoproteicos, como por exemplo a lipofuscina, pode se tornar mais intensa. (Agarwal e Sohal, 1994; Stadtman e Levine, 2000; Sohal, 2002).

Lipofuscina é uma forma especial de agregado autofluorescente, frequentemente observado durante o envelhecimento, composto por proteínas, lipídios, vestígios de carboidratos, metais e pigmentos conhecidos como ceroides (Brunk e Terman, 2002). A importância da lipofuscina na disfunção neuronal permanece desconhecida, mas acredita-se que estes agregados induzem neurotoxicidade através da formação de ROS (Brunk e Terman, 2002; Szweda *et al.*, 2003).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações neurológicas durante o envelhecimento ainda não são bem compreendidos. É possível que a imunoregulação prejudicada da microglia e o estresse oxidativo durante um desafio inflamatório possa determinar o acúmulo de proteínas neurotóxicas e consequente declínio na cognição dos idosos.

2. OBJETIVO

Avaliar o papel da inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade no déficit cognitivo associado ao envelhecimento.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o modelo experimental de inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade em camundongos jovens e envelhecidos;
- Avaliar parâmetros da resposta inflamatória sistêmica (contagem de leucócitos e citocinas plasmáticas) no modelo experimental;
- Avaliar parâmetros da resposta inflamatória no sistema nervoso central (ativação de células gliais e citocinas no cérebro) no modelo experimental;
- Comparar o desempenho cognitivo de camundongos jovens e envelhecidos frente ao desafio inflamatório crônico;
- Avaliar estresse oxidativo e outros mecanismos moleculares associados ao declínio cognitivo em camundongos frente ao desafio inflamatório crônico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob licença LW32/12 e LW36/10 (CEUA/FIOCRUZ). Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss Webster com idades entre 2-4 meses (jovens) e 14-18 meses (envelhecidos), fornecidos pelo biotério central da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em temperatura constante (25°C), com acesso livre a água e ração e ciclo de claro e escuro de doze horas no biotério do pavilhão Ozório de Almeida.

3.2. Modelo experimental de inflamação sistêmica

Para modelar a inflamação sistêmica de baixo grau e acompanhar todas as possíveis mudanças nos animais durante o modelo experimental, foram realizados dois tipos de modelos, o agudo e o crônico (Figura 6 e 7).

3.2.1. Modelo agudo

No modelo agudo, dois grupos de animais, com idades diferentes receberam uma injeção com lipopolissacarídeo (LPS *Escherichia coli*; sorotipo 0111:B4) via intraperitoneal (i.p.) na dose de 0,33 mg/kg e as amostras foram coletadas 4 horas e 7 dias após a injeção. Os camundongos jovens e envelhecidos do grupo controle foram manipulados junto com os demais animais, porém não receberam injeções, uma vez que as injeções *sham* também podem causar inflamação de baixa intensidade. A inflamação sistêmica (através da contagem de leucócitos e citocinas plasmáticas) foi acompanhada periodicamente.

3.2.2. Modelo crônico

No modelo crônico, os animais receberam uma injeção de LPS semanalmente, ao longo de 7 semanas e as amostras foram coletadas 4 horas e 7 dias após a última injeção do experimento. Os camundongos jovens e envelhecidos do grupo controle foram manipulados junto com os demais animais, porém não receberam injeções, uma vez que as injeções *sham* também podem causar inflamação de baixa intensidade. O peso dos animais e a inflamação sistêmica (através da contagem de leucócitos e citocinas plasmáticas) foram acompanhados periodicamente. Uma semana após a última injeção foram feitos os experimentos comportamentais.

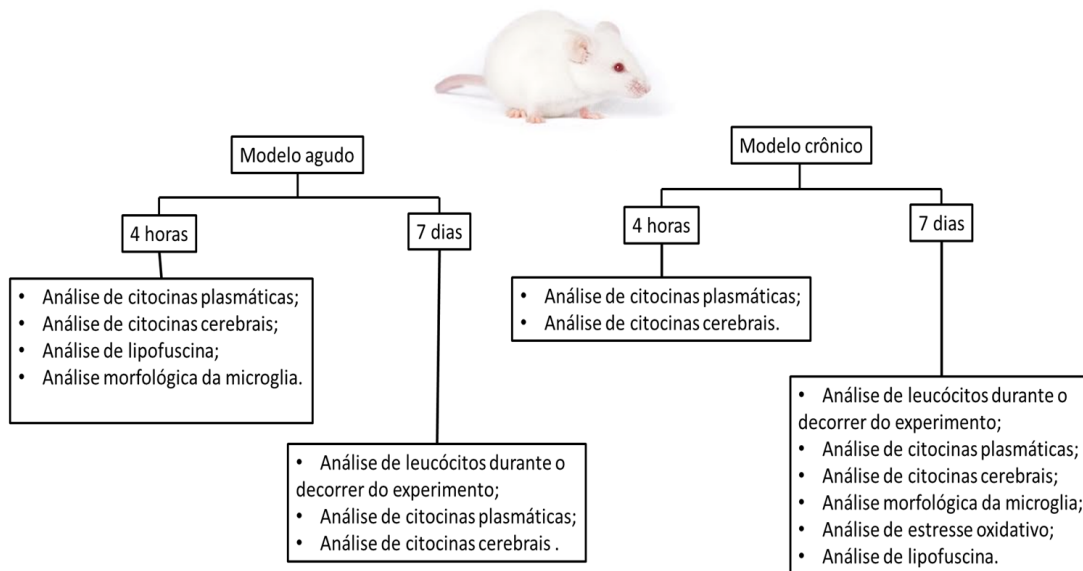


Figura 6. Fluxograma do desenho experimental. Em dois tipos de modelo de inflamação sistêmica de baixa intensidade, foram retirada amostras para diferentes análises nos tempo de 4 horas e 7 dias. Cada tempo analisado possui grupos jovens, jovens desafiados com LPS, envelhecidos e envelhecidos desafiados com LPS (aproximadamente 15 animais por grupo), sendo que cada tempo teve um experimento, com exceção do modelo crônico no tempo de 7 dias que teve 4 repetições do experimento.

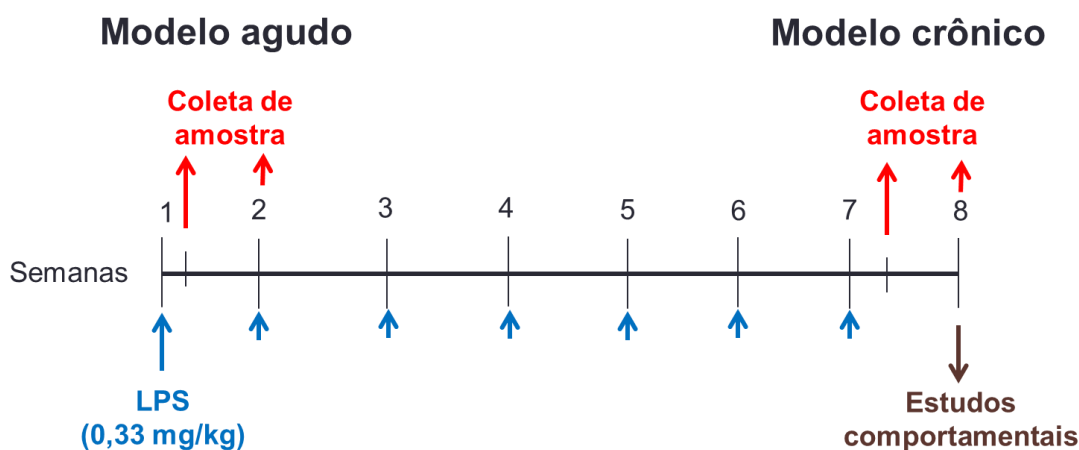


Figura 7. Modelo experimental. Indução da inflamação sistêmica aguda, através de uma injeção de LPS, e da inflamação sistêmica crônica através de injeções semanais de LPS durante 7 semanas; coleta das amostras 4 horas e 7 dias após a última injeção de cada modelo e estudos comportamentais realizados uma semana após a última injeção de LPS do modelo crônico.

3.3. Coleta de amostras

As amostras foram coletadas 4 horas e 7 dias após a última injeção dos modelos experimentais. Os camundongos Swiss Webster foram anestesiados por via inalatória com isoflurano e as amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca em seringa de 1mL heparinizada. O sangue foi armazenado em microtubos e centrifugado a 2500 rpm em centrífuga clínica por 10 minutos. O plasma foi coletado e estocado no freezer -80°C. Em seguida foi realizada perfusão do animal com solução salina 0,9% com auxílio de uma

máquina de perfusão durante 5 minutos e, após a lavagem de todo o sangue, foi feita a abertura do crânio para a remoção do cérebro dos animais. Estes cérebros foram divididos em dois hemisférios na linha medial: o hemisfério esquerdo foi acondicionado a -80°C para análises bioquímicas e o outro foi armazenado em solução de paraformaldeído 4% para os estudos histológicos.

3.4. Avaliação da inflamação sistêmica

3.4.1. Análise do escore clínico

Para nos certificarmos que a injeção não causou alterações clínicas graves nos animais, foi feita a análise do escore clínico nos tempos de 6 e 24 horas após as injeções de LPS, ao longo do experimento. Nesta avaliação, a maior pontuação se correlaciona com aumento da gravidade dos sintomas clínicos causados pelo estímulo inflamatório. Os camundongos foram avaliados com base nas variáveis apresentadas na figura 8 e, quando verificado alteração em algum dos parâmetros, foi acrescentado um ponto por alteração. Após análise, foram totalizados os pontos e, desta forma, foi determinada a gravidade dos sintomas clínicos.

Parâmetros
Piloereção
Contração abdominal
Alteração das fezes
Tônus corporal
Lacrimação
Fechamento de pálpebras
Atividade locomotora
Alteração da temperatura corporal
Alerta (escape ao toque)
Interesse pelo ambiente
Força ao agarrar
Taxa de respiração

Figura 8. Escore Clínico. Parâmetros definidos a fim de estabelecer gravidade dos sintomas clínicos causados pelo estímulo inflamatório. A temperatura corporal foi avaliada através do termômetro Laser Sensor digital.

3.4.2. Contagem total e diferencial de leucócitos

Para contagem total e diferencial, amostras de 5µl de sangue da cauda dos animais foram retirados em diferentes tempos do experimento (figura 9). O sangue retirado foi diluído em solução de Turk, e a contagem total de leucócitos foi efetuada em câmaras de Neubauer com auxílio do microscópio óptico (aumento de 10X). A análise diferencial de leucócitos foi realizada por esfregaço sanguíneo e, posteriormente, as lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido LB (Laborclin Ltda, BR) segundo instruções do fabricante. Foram contadas 100 células consecutivas em microscópio de luz, com objetiva de imersão em óleo (aumento de 100X). A metodologia aplicada na realização da contagem diferencial destas células permitiu determinar o valor absoluto de cada tipo celular a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

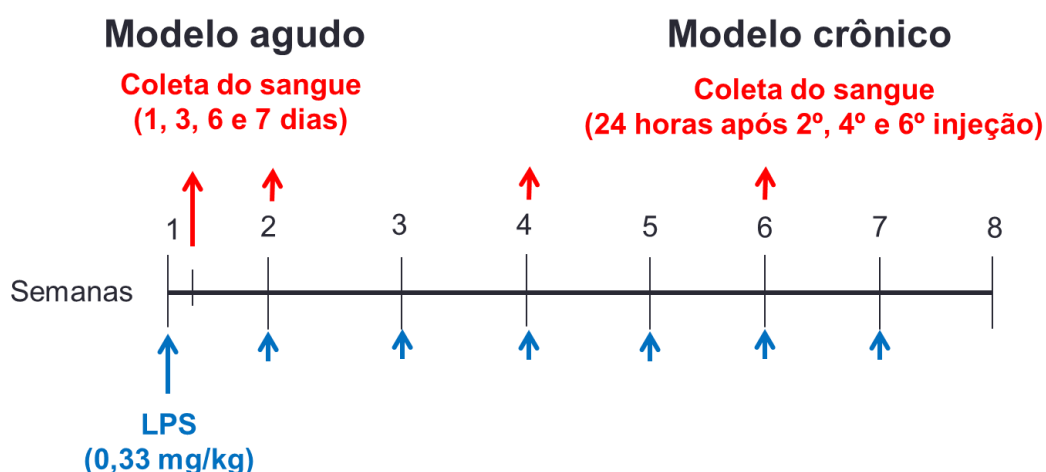


Figura 9. Desenho experimental da contagem total/diferencial. A retirada do sangue foi feita no modelo agudo nos tempos 0 (antes da primeira injeção de LPS), 1, 3, 6 e 7 dias após a primeira injeção de LPS e no modelo crônico, 24 horas após a 2ª, 4ª e 6ª injeção de LPS.

3.4.3. Análise de citocinas

As citocinas foram quantificadas no plasma e no cérebro dos animais por ELISA utilizando o duo set kit (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A coleta de sangue foi feita em diferentes etapas do modelo experimental (figura 10). O sangue foi retirado antes da coleta do cérebro dos animais, através de seringa de 1mL heparinizada e centrifugado a 2500 rpm. Para realização do ELISA, placas de fundo chato (Nunc) para ensaio em volume reduzido foram cobertas com o anticorpo de captura (50µL/poço) e seladas com filme plástico. Após incubação overnight a 4°C, as placas foram lavadas 4X com tampão de lavagem (100µL/poço de 1L de PBS1X + 500µL de Tween® 20) e incubadas durante 1 hora com a solução de bloqueio (50µL/poço de 100mL PBS 1X + 1g BSA (Sigma Aldrich) em

temperatura ambiente. A curva padrão foi diluída em solução de bloqueio + Tween® 20 e aplicada na placa, bem como as amostras (50µL/poço). Após nova incubação overnight a 4°C, as placas foram lavadas 6X com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em solução de bloqueio+ Tween® 20 (50µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 8X com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (50µL/poço de 25uL de Streptavidina-peroxidase (R&D) + 5mL de Tampão de bloqueio com Tween® 20). Trinta minutos após a incubação no escuro, foi acrescida a solução de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi parada com solução de parada (50µL/poço de 10,65mL de H2SO4 (Merck) + Água MilliQ q.s.p. 1L) e a absorbância a 405 nm foi determinada pela leitora de placas (Spectr Max 190).

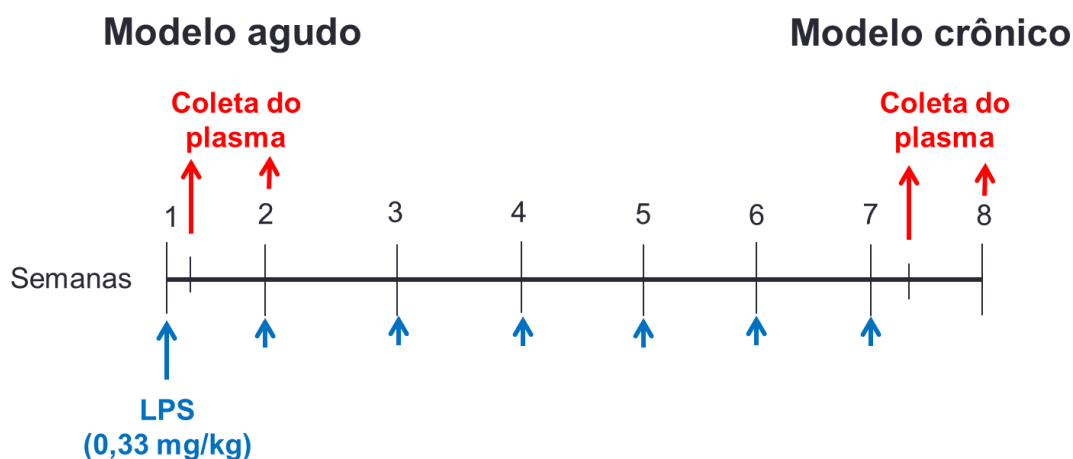


Figura 10. Desenho experimental da coleta do plasma. A retirada do sangue foi feita nos tempos de 4 horas e 7 dias no modelo agudo e no modelo crônico.

3.5. Avaliação comportamental

3.5.1. Teste de habituação em campo aberto

Para certificar que os animais não possuíam alterações de locomoção após as injeções de LPS, o teste de habituação em campo aberto foi feito 7 dias após as injeções de LPS. O teste consiste em colocar cuidadosamente os animais em um campo aberto de 40x60 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. Os animais tiveram 3 minutos para explorar livremente o ambiente e, imediatamente após, os animais voltam para a caixa moradia. Os números de cruzamentos (“crossings”) através das linhas pretas e o número de “rearings” foram avaliados.

3.5.2. Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos consiste em um experimento de dois dias que se baseia na curiosidade natural dos roedores em explorar ambientes e novos objetos. Uma semana após a última injeção de LPS, os animais foram expostos à caixa de atividades sem nenhum objeto durante 10 minutos, para que se habituassem à arena de experimentação. No segundo dia, foi realizada a sessão de treino, onde os animais foram colocados por 5 minutos na mesma caixa de atividades, desta vez contendo dois objetos idênticos (A1 e A2). No mesmo dia, 3 horas após o treino, os animais foram recolocados na mesma caixa, agora na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (B), e novamente exploraram o ambiente por 5 minutos. O experimento foi filmado e o tempo de exploração de cada objeto foi quantificado por um observador cego aos grupos experimentais. O aumento do tempo de exploração do objeto novo (B) em relação ao objeto familiar (A1 ou A2) indica que o animal adquiriu memória e reconheceu o objeto familiar. Para evitar viés em relação a animais estressados ou imóveis, os resultados de exploração na habituação foram analisados e os animais que não exploraram nenhum dos objetos foram retirados do experimento.

3.5.3. Labirinto aquático de Morris

O teste labirinto aquático de Morris foi realizado uma semana após a última injeção de LPS, para avaliar a capacidade cognitiva associada à memória espacial. Esse tipo de memória (que envolve o lobo temporal medial, na região do hipocampo) permite a formação de um mapa cognitivo do espaço externo ao qual o animal se encontra e através do qual lhe permitirá melhor interação com o ambiente. O labirinto aquático consiste em um tanque circular com diâmetro de 1,04 m e com altura de 55 cm, localizado no interior de uma sala com algumas pistas visuais fixada nas paredes. O tanque foi preenchido com água e dividido em 4 quadrantes, sendo que em um dos quadrantes, foi colocada uma plataforma de acrílico transparente (13x30x13cm) submersa a 1 cm da superfície da água. O experimento foi registrado em câmera Samsung. Os animais foram submetidos a um treino por dia, durante 4 dias, onde os animais tiveram 60 segundos para tentar encontrar a plataforma. Caso o animal não encontrasse a plataforma neste período de tempo, o mesmo seria conduzido manualmente até a mesma após 60 segundos. Durante todas as sessões de treino, o tempo (latência) necessário para encontrar a plataforma foi anotado. No quinto e último dia foi realizada a sessão de teste, em que a plataforma foi retirada e foi registrado o tempo gasto pelos camundongos no quadrante em que se encontrava a plataforma durante 60 segundos através do programa AnyMaze.

3.6. Imunohistoquímica

Os cérebros perfundidos com solução salina foram imediatamente armazenados em solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS durante três dias, seguido de solução crioprotetora de sacarose 20% em PBS por dois dias a 4°C. As amostras foram então congeladas em gelo seco pulverizado e cortes coronais de 40 µm foram obtidos em criostato. As fatias de tecido foram obtidas de maneira sistemática e armazenadas em placas de 24 poços em PBS + azida 0,2% a 4°C, de maneira que fatias de regiões cerebrais equivalentes de cada animal foram utilizadas em cada imunohistoquímica. Para controle do background causado pelo acúmulo de autofluorescência no envelhecimento, as fatias foram lavadas em PBS e tratadas com Sudan Black B (0,1% em etanol 70%) por 30 minutos. As fatias foram incubadas com tampão de bloqueio (soro normal de cabra 5%, albumina de soro bovino 3% em solução de tampão fosfato contendo 0,3% de Triton X-100) por uma hora à temperatura ambiente em agitação leve e constante. Os cortes foram incubados com anticorpo primário em tampão de bloqueio, e deixados em agitação *overnight*. Para marcação de microglia, o anticorpo primário utilizado foi o coelho anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) (1:400, Wako Chemicals); para a análise de astrogliose foi utilizado o anticorpo primário de coelho anti- GFAP (1:1000, Millipore); para análise do dano oxidativo, foi utilizado o anticorpo primário de coelho anti- 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (1:400, Alpha Diagnostic). Após serem lavadas três vezes em PBS, as seções foram incubadas com anticorpo secundário de cabra Alexa 488 anti-IgG de coelho (1:1000) em tampão de bloqueio por duas horas. Os cortes foram lavados duas vezes com PBS e montados em lâminas com meio de montagem (Vectashield) com DAPI. As fatias foram fotografadas em microscópio de fluorescência (objetiva 20x) e em microscópio confocal (objetiva 63x).

3.7. Quantificação da ativação de células gliais

A ativação da microglia foi avaliada em diferentes regiões do hipocampo (CA1, CA3 e giro denteado) e córtex cerebral com auxílio do programa ImageJ. A análise da ativação de microglia foi realizada a partir da observação de padrões morfológicos característicos: microglias ameboides e com poucas ramificações saindo de seu corpo celular foram consideradas ativadas, e micróglias com muitas ramificações saindo de seu corpo celular foram consideradas normais (não ativadas). A ativação de microglia foi expressa em porcentagem de células Iba-1 positivas com morfologia ativada. Para isso foi feita a contagem do número total de células Iba-1 positivas por campo (aproximadamente 6 por animal), e no mesmo campo foi feita a contagem de micróglias ativadas. A média da porcentagem dos campos por animal foi considerada o resultado final. A análise foi feita de forma cega.

A astrogliose foi observada na região da camada 1 e 2 do córtex pré-frontal dos camundongos tratados com LPS, em cortes sagitais de cérebro. A astrogliose foi quantificada pela intensidade de fluorescência relativa à imunomarcação de GFAP por campo (aproximadamente 6 campos por animal) com o auxílio do programa ImageJ. A média da intensidade de fluorescência por animal foi considerada o resultado final. A análise foi feita de forma cega.

3.8. Dosagem de proteínas pelo método BCA

As amostras de cérebro coletadas foram homogeneizadas em tampão RIPA contendo inibidores de protease (Complete mini EDTA-free /Roche) e de fosfatase, seguido de uma incubação de 30 minutos no gelo. Após, o homogeneizado foi sonificado por 3 minutos e centrifugado a 10.000xg. O reagente BCA de trabalho foi preparado adicionando-se cinquenta partes de Reagente BCA A e uma parte de Reagente BCA B. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2mg/mL) foi feita através de diluições seriadas a partir de albumina humana fornecida pelo fabricante. Inicialmente, as amostras totais homogeneizadas foram diluídas em 10x numa solução de PBS 1X, de modo que, em 10 µL de cada amostra foi colocado em 90 µL de PBS. Feito isso, 10µL das amostras previamente diluídas foram adicionados em placas de 96 poços de fundo chato ao qual foram adicionados, posteriormente, 200µL do reagente de trabalho descrito acima. A placa foi incubada em estufa a 37°C por trinta minutos e a leitura das amostras foi realizada a 562 nm na leitora de placas.

3.9. Western Blotting

As amostras foram preparadas em tampão de amostra 1:1, de modo que a concentração final de proteínas em cada poço do gel fosse igual a 50µg/15µl. Para realização do ensaio de *Western blotting*, foi utilizado o protocolo segundo o manual fabricante *Odyssey System™* (Li-Cor, Biociences, EUA). Aplicou-se 10 µl do padrão de peso molecular (RAINBOW *Odyssey system™* - Li-Cor, Biociences). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese (em gel de acrilamida 4-20%, *Mini-Protean TGX precast Gels®*- BioRad) com a aplicação de 120 V por duas horas. Em seguida, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose (*Odyssey system™* - Li-Cor, Biociences, EUA) previamente permeabilizada em metanol 100%, utilizando tampão de transferência. A transferência foi realizada a 90V por 90 minutos em sistema semi-seco (Amersham Biosciences). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueadora (*Odyssey System™* - Li-Cor, Biociences, EUA). Posteriormente, a mesma foi incubada *overnight*, protegida da luz, com anticorpo primário diluído em solução bloqueadora e TBS tween 1:1. Para avaliação do estresse

oxidativo, foi utilizado o anticorpo primário *mouse* anti-4-hidroxi-2-nonenal (HNE)(1:500, Abcam) e para normalização foi utilizado o anticorpo primário *goat* anti-actina (1:3000, Santa Cruz). As proteínas de interesse foram identificadas pela incubação da membrana por meia hora, com os anticorpos secundários diluídos em tampão. As membranas foram escaneadas e a detecção das bandas foi feita através da densitometria com auxílio do software *Odyssey Infrared Imaging System*®.

3.10. Quantificação da expressão de mRNA

3.10.1. Extração de RNA

Os cérebros recolhidos foram fragmentados, homogeneizados e armazenados em tubos livre de RNase (Axygen) com 1000 µL de reagente Trizol® (Invitrogen) a -20°C. Todo o procedimento foi feito seguindo as recomendações do reagente Trizol® Reagent (Invitrogen). Para a extração e purificação do RNA, foram adicionados 200 µL de clorofórmio às amostras. Com auxílio do vórtex, as amostras foram homogeneizadas por 30 segundos e posteriormente centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, e foi adicionado 500 µL de isopropanol. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e depois foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol a 75 % e centrifugado a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Esperou-se o álcool evaporar em temperatura ambiente na capela por 5-10 minutos. O RNA foi resuspenso em 20 µL de água livre de RNase e incubado em placa de aquecimento em 55-60°C por 15 minutos. O RNA foi quantificado através da utilização do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e armazenado a -80°C para uso posterior.

3.10.2. Transcrição reversa do RNA (RT)

O cDNA foi sintetizado utilizando kit específico (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen). Para isso, 1 µg de cada amostra de RNA foi misturado com 1 µL de dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate) a 10 mM, 1 µL de primer oligodT (Invitrogen, 0,5 µg/µL), e completado com água (livre de RNase) até 10 µL. Esta mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C e resfriada em gelo por 1 minuto. Em seguida, adicionaram-se em cada tubo os seguintes reagentes: 2 µL de RT buffer 10x, 4 µL de MgCl₂ a 25 mM e 1 µL de DTT a 0,1 M (Invitrogen). Os tubos foram aquecidos a 65°C por 5 minutos e resfriados em gelo por 1 minuto. Logo após, adicionou-se 1 µL de enzima SuperScript II RT (Invitrogen,

50U/ μ L) em cada tubo e as amostras foram aquecidas a 42°C por 50 minutos e depois a 70°C por 15 minutos. Após este período, foi adicionado 1 μ L de RNase H (2 U/ μ L) por tubo, que foram em seguida, incubados por 30 minutos a 37°C. O cDNA foi armazenado a -20°C.

3.10.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR)

Os transcritos obtidos da reação de transcriptase reversa foram quantificados por PCR fluorogênico quantitativo em tempo real utilizando o sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Para tanto, foram misturados 5 μ L de Master Mix 2X; 0,5 μ L do primer 20X; 1 μ L da amostra de cDNA e 3,5 μ L de água livre de RNase. A amplificação foi realizada no aparelho de PCR em tempo real modelo 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os primers utilizados foram: SOD1 (TGC CCA GGT CTC CAA CAT G), CAT (AGA GAG CGG ATT CCT GAG AGA) e HPRT (AGG ACC TCT CGA AGT GTT GG) em concentração 300nM. A expressão dos níveis de RNA foi calculada pelo método de 'delta delta Ct' ($\Delta\Delta$ Ct) (Livak e Schmittgen, 2001) e normalizadas em relação aos níveis de expressão do gene constitutivo *HPRT*.

3.11. Quantificação de lipofuscina

O conteúdo de lipofuscina foi quantificado em fatias de tecido diretamente montadas em lâminas com meio de montagem (Vectashield) com DAPI, sem nenhum tipo de tratamento, e fotografadas em microscópio de fluorescência nos canais vermelho e verde com objetiva 20x. A análise quantitativa da fluorescência das imagens obtidas no canal vermelho foi feita em regiões equivalentes do córtex cerebral dos animais envelhecidos controles e nos tratados com LPS com auxílio do programa ImageJ. A média dos valores do grupo controle foi dada como 100%, os valores do grupo LPS foi dado em relação a essa média. Os animais jovens não apresentam agregados de lipofuscina, como mostrado nos resultados. Para eliminar a autofluorescência, foi feito um tratamento de 30 minutos com Sudan Black B 0,1%.

3.12. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm SEM. As análises de leucócitos, citocinas plasmáticas e cerebrais, astrogliose, ativação microglial, expressão das enzimas antioxidantes,, teste de campo aberto e labirinto aquático de Morris foram feitas utilizando o teste ANOVA de duas vias (idade e tratamento) e pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos com idades diferentes; para análise dentro do grupo com mesma idade foi utilizado o teste t. Dados do teste de reconhecimento de objetos e de quantificação de lipofuscina foram analisados utilizando o teste *t* de uma amostra (utilizando 50% como valor

referência). Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados como indicando significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1. Acompanhamento da inflamação sistêmica no modelo experimental

4.1.2. Pesagem dos animais

O peso dos animais foi acompanhado durante todo o experimento. Observamos através da figura 11 que o desafio crônico com LPS não interfere no peso dos animais, independente da idade que possuam.

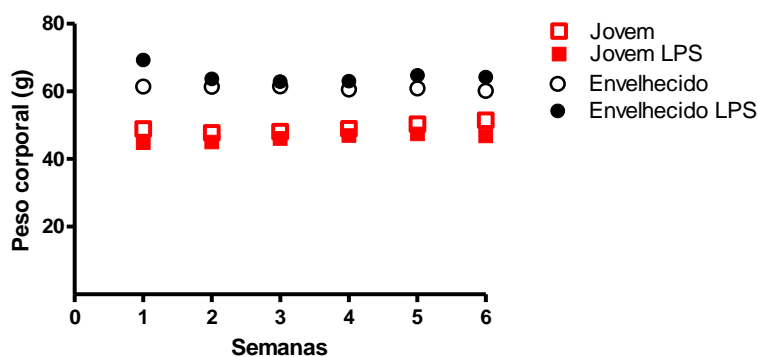


Figura 11. Pesagem dos animais durante o curso da inflamação sistêmica crônica (JV= 5; JV LPS=6; ENV=8; ENV LPS=7; valores referentes a um experimento crônico).

4.1.2. Análise do escore clínico

O escore clínico foi avaliado nos camundongos envelhecidos (n=14) e jovens (n=10) através de parâmetros característicos de um quadro infeccioso 6 e 24 horas após cada injeção de. Na figura 12, constatamos que as injeções de LPS não induziram alterações no quadro clínico que indicassem sepse moderada ou grave nos animais, quando comparados ao grupo controle (n=4). Também é possível observar que, ao compararmos animais jovens e envelhecidos, os animais envelhecidos possuem um aumento do escore clínico, possivelmente relativo à idade dos camundongos.

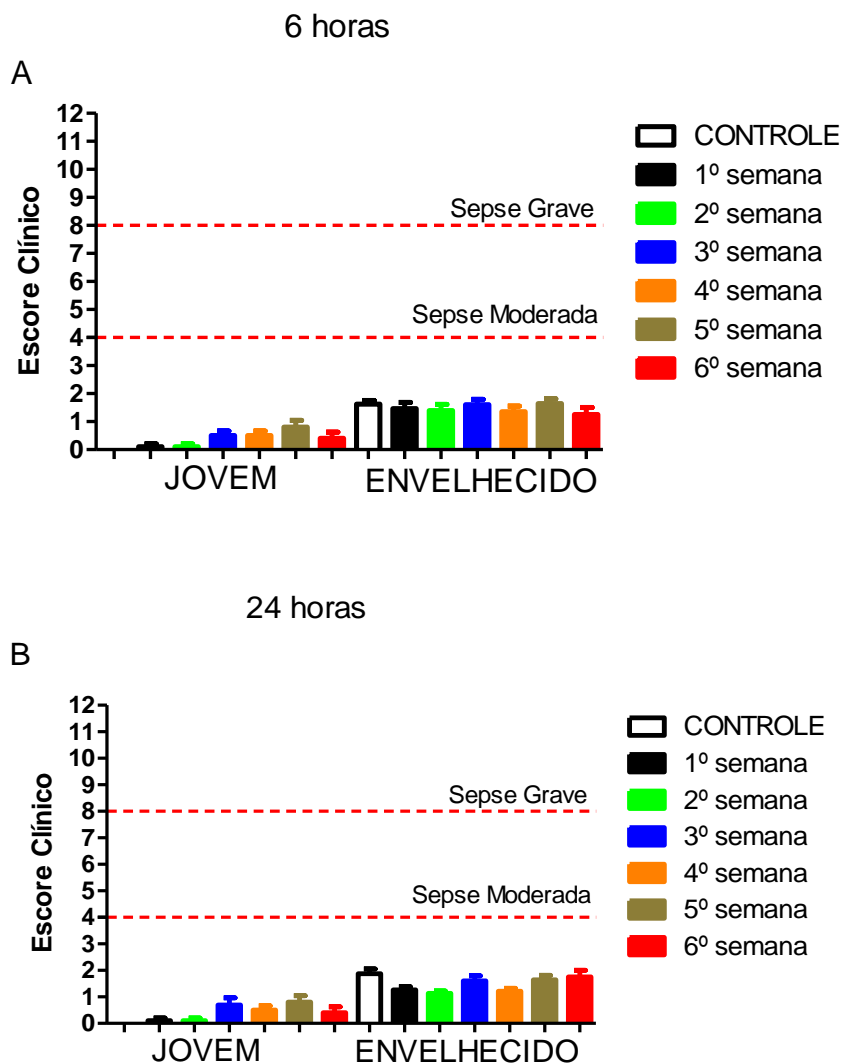


Figura 12. Quantificação da gravidade dos sintomas clínicos após o desafio com LPS. Os gráficos mostram a gravidade do quadro clínico dos animais, durante o curso do modelo crônico, 6 horas (A) e 24 horas (B) após as injeções semanais de LPS.

4.1.3. Contagem total e diferencial de leucócitos

A inflamação sistêmica foi acompanhada através da contagem total e diferencial de leucócitos no sangue. No modelo agudo (figura 13), pode-se observar que há um aumento exacerbado de leucócitos totais nos animais envelhecidos 24 horas após a primeira injeção de LPS (análise estatística pós-teste de Bonferroni)(figura 13A). A contagem de polimorfonucleares na figura 13B mostra que, no tempo de 4 horas após a injeção de LPS, os animais jovens apresentaram um aumento significativo de neutrófilos no sangue, em comparação ao seu grupo controle (análise estatística teste t). Ao analisar o grupo de animais envelhecidos, observa-se que o aumento dos polimorfonucleares ocorre 24 horas após a injeção de LPS e é significativo quando comparado aos demais grupos (análise estatística pós-

teste de Bonferroni). Podemos observar também no tempo agudo que os animais jovens apresentam diminuição de células mononucleares no sangue 1 e 24 horas após a primeira injeção de LPS e aumento destas células 6 a 7 dias depois em comparação ao seu controle (análise estatística teste t) (Figura 13C). Os animais envelhecidos apresentam aumento de células mononucleares 24 horas, 3 dias e 6 dias em comparação ao controle, mas no 7º dia após a injeção de LPS, houve diminuição de monócitos (análise estatística teste t). Quando comparados aos jovens, os animais envelhecidos apresentaram aumento de células mononucleares 24 horas, 3 e 7 dias após a primeira injeção de LPS (análise estatística pós-teste de Bonferroni).

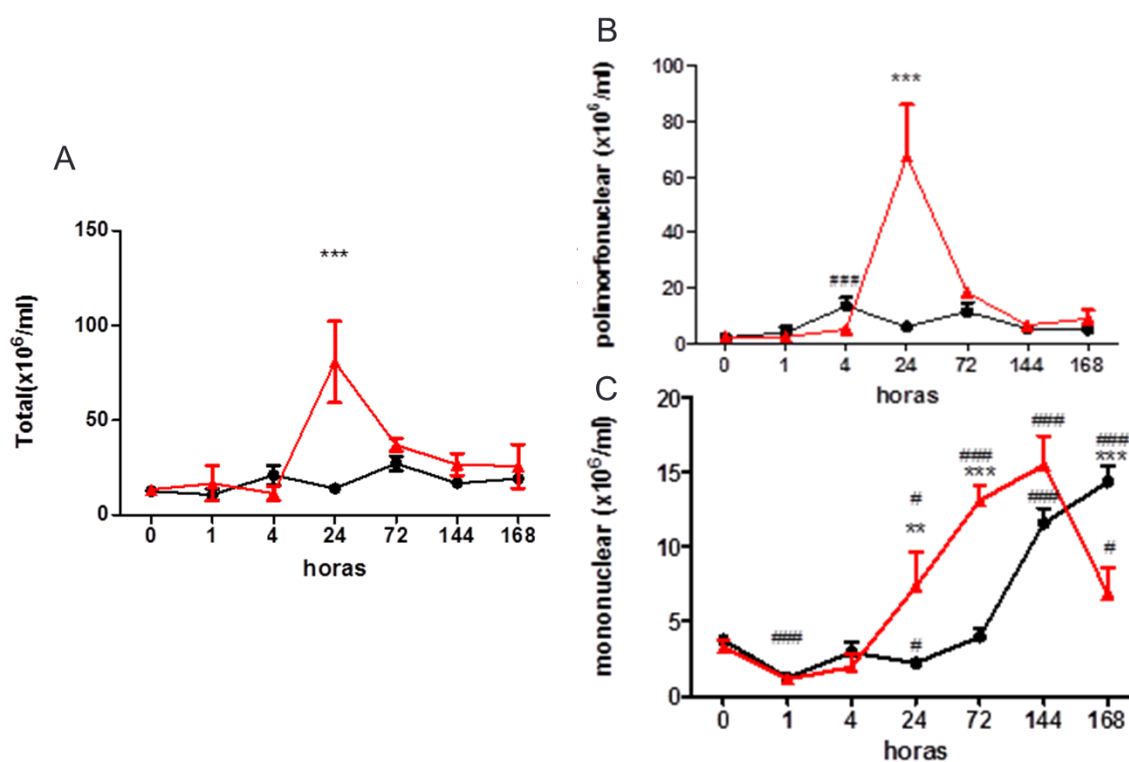


Figura 13. Contagem de células totais/diferenciais no modelo agudo. (A) – Contagem de leucócitos totais: efeito significativo: idade ***, tratamento *** e interação entre os fatores ***; (B) - contagem de polimorfonucleares: efeito significativo: idade ***, tratamento *** e interação entre os fatores ***; (C) – contagem de mononucleares: efeito significativo: idade *, tratamento *** e interação entre os fatores ***. Número de animais = 6. Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) e teste t (##p<0,01, ###p<0,001).

No modelo crônico (figura 14), observamos que o número de leucócitos totais dos animais envelhecidos só aumenta significativamente 24 horas após a sexta injeção de LPS, quando comparados com os animais jovens no mesmo tempo. Estes resultados indicam que os animais envelhecidos possuem uma alteração na resposta inflamatória quando comparados aos animais jovens. A contagem de polimorfonucleares na figura 14B mostra que há aumento

significativo de neutrófilos apenas no tempo de 24 horas após a 4^o injeção de LPS (análise estatística teste t) em comparação ao seu grupo controle; no grupo de envelhecidos, o aumento significativo foi encontrado em todos os tempos quando comparados com o seu grupo controle (análise estatística teste t). Ainda no mesmo gráfico, podemos observar que o número de células polimorfonucleares dos animais envelhecidos permanece aumentado 2^o e 6^o semana, quando comparados aos animais jovens (análise estatística pós-teste de Bonferroni). Estes resultados indicam que a resposta de células polimorfonucleares (majoritariamente neutrófilos) dos animais envelhecidos ao desafio inflamatório com LPS é lenta e exacerbada na fase aguda e crônica. Na contagem de células mononucleares no modelo crônico (figura 14C), observamos que o aumento de células mononucleares dos animais envelhecidos só ocorre 24 horas após a sexta injeção de LPS, tanto em comparação com os animais jovens, quanto em comparação ao seu controle. Em conjunto, estes resultados indicam que a resposta de células mononucleares ao desafio com LPS na fase aguda é mais precoce e menos duradoura nos animais envelhecidos em comparação aos animais jovens.

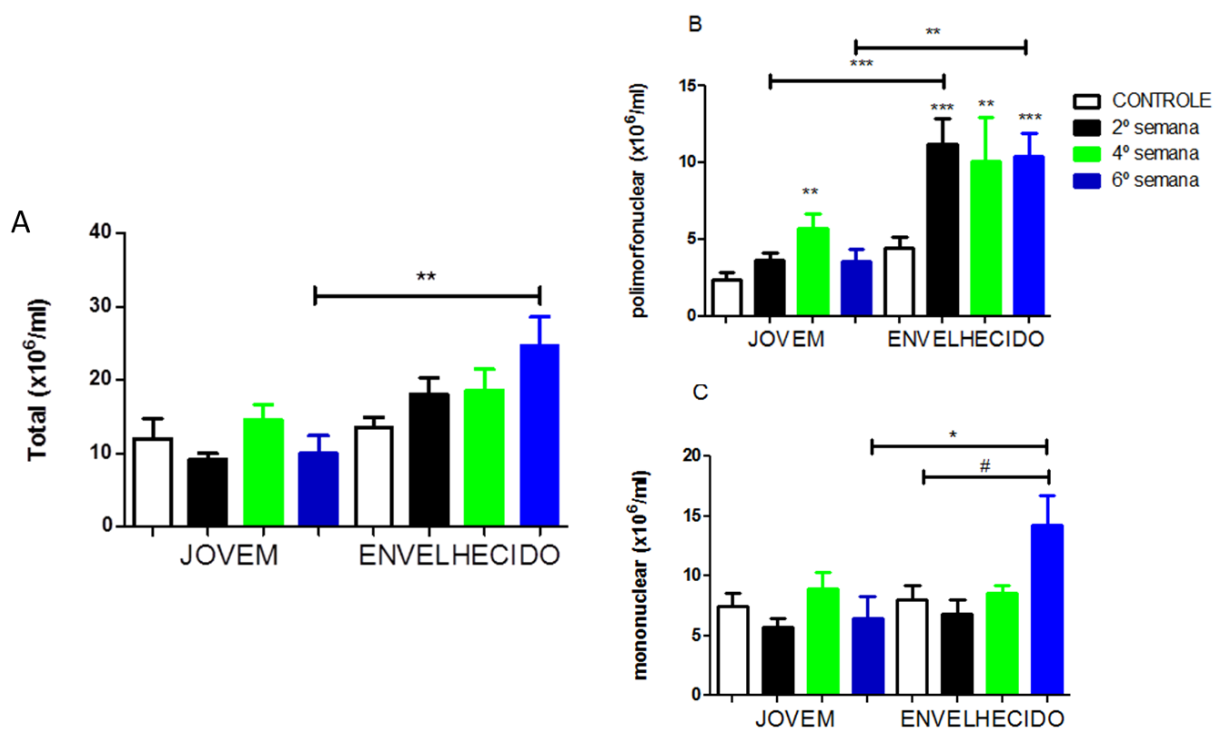


Figura 14. Contagem de células totais/diferenciais no modelo crônico. (A) – Contagem de leucócitos totais: efeito significativo: idade; (B) - contagem de polimorfonucleares: efeito significativo: idade ***, tratamento ***; (C) – contagem de mononucleares: efeito significativo: idade *. Número de animais: JV=9, ENV=7. Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (*p<0,05;**p<0,01; ***p<0,001) e teste t (##p<0,01, ###p<0,001).

4.1.3. Análise de citocinas plasmáticas

A figura 15 representa os níveis sanguíneos de citocinas em diferentes tempos após o modelo agudo. É possível observar que os animais envelhecidos possuem um aumento significativo de IL-1b no sangue sete dias após a injeção de LPS quando comparados ao grupo jovem ou ao seu grupo controle (15A) e este aumento não foi observado nos animais jovens, indicando que animais envelhecidos possuem uma resposta inflamatória exacerbada na etapa aguda do experimento. Na análise de IL-6 (15B), observamos que os animais jovens apresentaram um aumento de IL-6 tanto em comparação com seu grupo controle quanto em comparação aos animais envelhecidos, este aumento não ocorreu nos animais envelhecidos. Na análise de IL-10 (15C), não há diferença significativa nos níveis de IL-10 no sangue dos animais. Mas ao observamos os níveis da citocina pro-resolutiva IL-4(15D), podemos observar uma diminuição desta citocina nos animais envelhecidos desafiados com LPS.

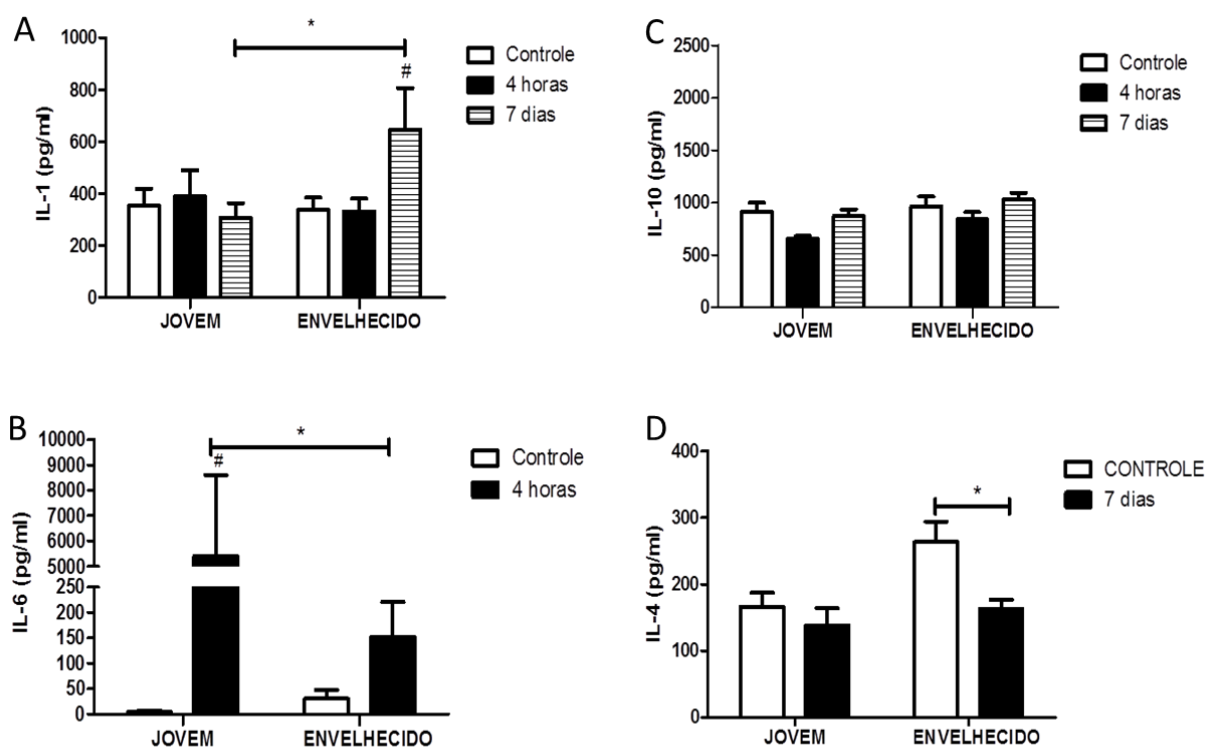


Figura 15. Concentração de citocinas no sangue no modelo agudo. (A) - Análise de IL-1b feita 4 horas (n= 4 por grupo) e 7 dias (n= 6 por grupo). Efeito significativo: interação entre os fatores *; (B) - Análise de IL-6 feita 7 dias (n= 4 por grupo). Efeito significativo: interação entre os fatores *; (C) - Análise de IL-10 feita 4 horas (n= 4 por grupo) e 7 dias (n= 5 por grupo); (D) – Análise de IL-4 feita 7 dias (n= 5 por grupo). Efeito significativo: idade *, tratamento *. Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (*p<0,05) e teste t (#p<0,05).

No modelo crônico (figura 16), não há diferenças significativas nos níveis sanguíneos das citocinas pró-inflamatórias IL-1b e IL-6 em nenhum dos grupos. Na análise das citocinas

pró-resolutivas, podemos observar um aumento nos níveis de IL-10 e IL-4 nos animais jovens 7 dias após todo o curso do experimento tanto em comparação ao seu grupo controle, quanto em comparação aos animais envelhecidos no mesmo tempo, indicando que, nos tempos observados, os animais envelhecidos não respondem da mesma forma que os animais jovens.

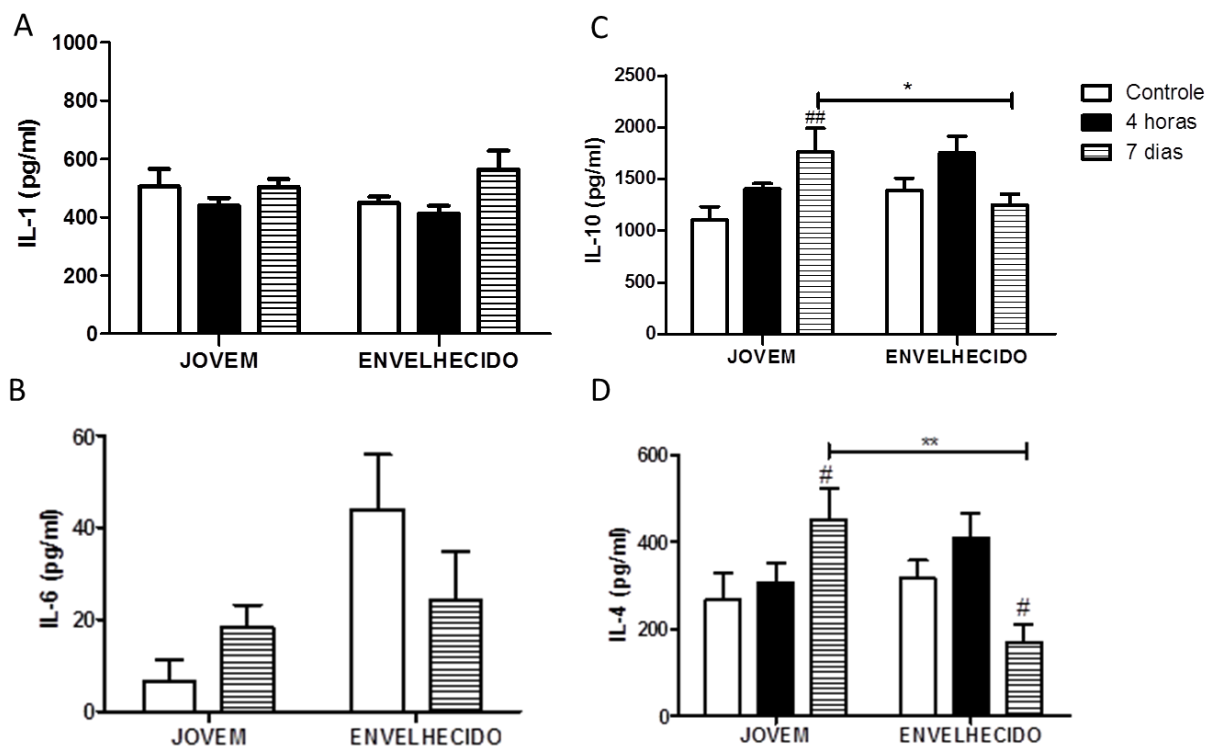


Figura 16. Concentração de citocinas no sangue no modelo crônico. (A) – Análise de IL-1b feita 4 horas (n=5 por grupo) e 7 dias (n=14); (B) - Análise de IL-6 feita 7 dias (n=8 por grupo); (C) – Análise de IL-10 feita 4 horas (n=5 por grupo) e 7 dias (n=14). Efeito significativo: interação entre os fatores *. (D) - Análise de IL-4 feita 4 horas (n=5 por grupo) e 7 dias (n=10). Efeito significativo: interação entre os fatores **. Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (*p<0,05; **p<0,01) e teste t (#p<0,05).

4.2. Caracterização do déficit cognitivo após inflamação sistêmica crônica

4.2.1 Teste de habituação em campo aberto

No teste de habituação em campo aberto foi analisado a atividade exploratória/locomotora do animal 7 dias após cada injeção de LPS. Observamos através da figura 17 que os animais envelhecidos controle já iniciam o teste com uma atividade exploratória menor que os animais jovens, mas o desafio com LPS não alterou significativamente este resultado, excluindo a possibilidade do LPS ser um fator desencadeante de prejuízos exploratórios e locomotores que pudessem influenciar nos

resultados cognitivos. Podemos analisar também que os grupos habituaram à caixa de atividade, com exceção do grupo envelhecido.

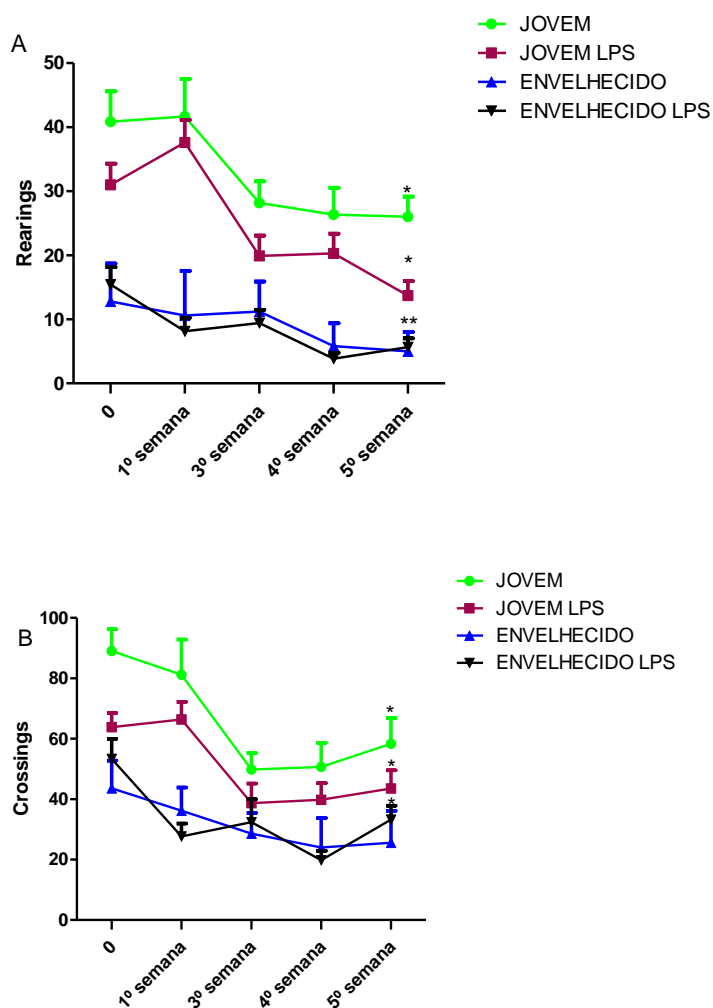


Figura 17. Análise da atividade exploratória dos animais. A análise de rearings (A) e crossings (B) dos animais foi analisada 7 dias após as injeções durante o modelo crônico (efeito significativo: idade *** e interação entre os fatores ***). Grupo jovem desafiado com LPS (n= 10); grupo envelhecido desafiado com LPS (n=14); (jovem e env n= 5). Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (*p<0,05).

4.2.2. Teste de reconhecimento de objetos

A caracterização do prejuízo cognitivo no modelo de inflamação sistêmica crônica foi feita através da avaliação comportamental pelo teste de reconhecimento de objetos (figura 18). Observamos neste teste que, três horas depois da sessão treino, os animais jovens, tanto controles quanto tratados com LPS, exploram mais o objeto novo que o objeto familiar (Figura 20A). Na figura 18B, apenas os animais envelhecidos controle exploram mais o

objeto novo. Os animais envelhecidos desafiados com LPS cronicamente exploram ambos os objetos novo e familiar na mesma proporção, indicando que estes animais não se lembraram do objeto familiar neste teste. Este resultado indica que o tratamento crônico com LPS gerou um déficit cognitivo apenas nos camundongos envelhecidos, e não nos jovens.

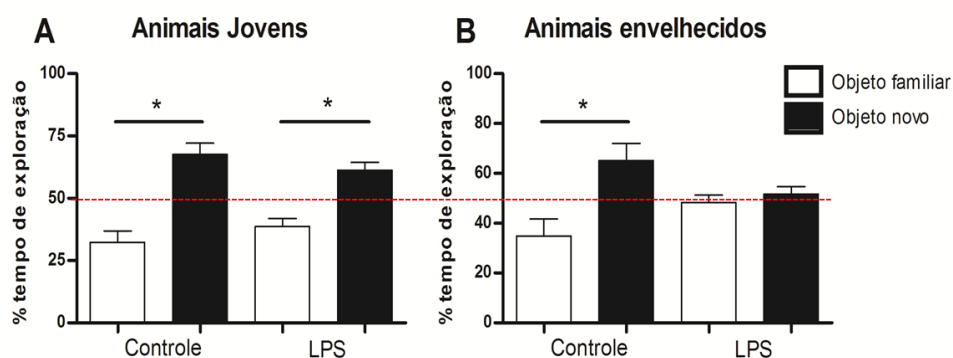


Figura 18. A inflamação sistêmica crônica afeta a memória de curta duração nos animais envelhecidos. Os animais jovens (JV e JV LPS n=9) tem memória, mesmo após a inflamação crônica (A) enquanto que os animais envelhecidos (ENV e ENV LPS n=5) após a inflamação crônica exploram igualmente os dois objetos (B). O gráfico representa dois experimentos independentes agrupados. Análise estatística One sample T Teste (* P<0,05 é estatisticamente diferente de 50%).

4.2.3. Labirinto aquático de Morris

A figura 19 representa os resultados da avaliação cognitiva pelo teste de labirinto aquático de Morris. Observamos na curva de aprendizado (figura A) que todos os grupos aprenderam o local da plataforma. Na figura B, observamos que não há diferença na velocidade de nado dos animais. Na figura C, percebemos que os animais envelhecidos desafiados com LPS (ENV LPS) permaneceram significativamente menos tempo nadando no quadrante onde havia a plataforma em relação aos animais envelhecidos controle (ENV), indicando que os animais envelhecidos desafiados com LPS possuem perda de memória espacial.

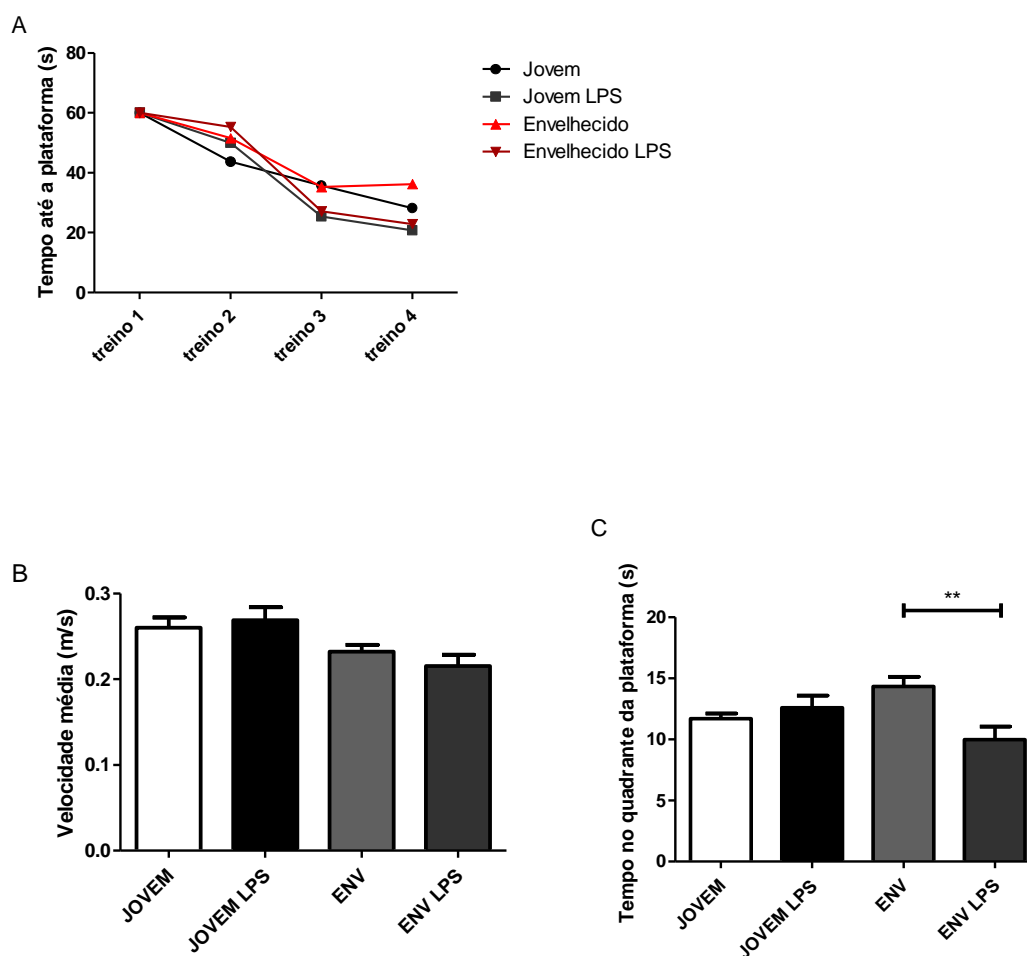


Figura 19. Avaliação da memória espacial no labirinto aquático de Morris. (A) curva de aprendizado durante os dias de treino; (B) velocidade média dos animais no dia teste; (C) tempo de nado no quadrante em que se encontrava a plataforma (dia teste). (efeito significativo: tratamento ** e interação entre os fatores *). (JV e JV LPS n=10; ENV e ENV LPS n=13) Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (**p<0,01).

4.3. Neuroinflamação

4.3.1 Ativação de astrócitos no hipocampo

A figura 20 mostra imagens representativas da astrogliose no córtex pré-frontal dos animais (20A). Podemos observar que nos animais jovens (JV e JV LPS) a marcação do GFAP está bem reduzida nos prolongamentos dos astrócitos. Já nos animais envelhecidos (ENV e ENV LPS), é possível notar que esta marcação está bem forte, principalmente nos animais desafiados com LPS (20B). A quantificação da ativação de astrócitos foi realizada no modelo crônico do desafio inflamatório com LPS. A figura 21 mostra que os animais jovens desafiados com LPS não possuem alteração significativa na intensidade de marcação de

GFAP, em comparação ao seu controle. Ao analisarmos os animais envelhecidos, percebe-se que o grupo desafiado com LPS apresenta aumento de intensidade de GFAP. Podemos concluir desses resultados que o desafio inflamatório crônico induziu aumento na marcação de GFAP nos animais envelhecidos (ENV LPS).

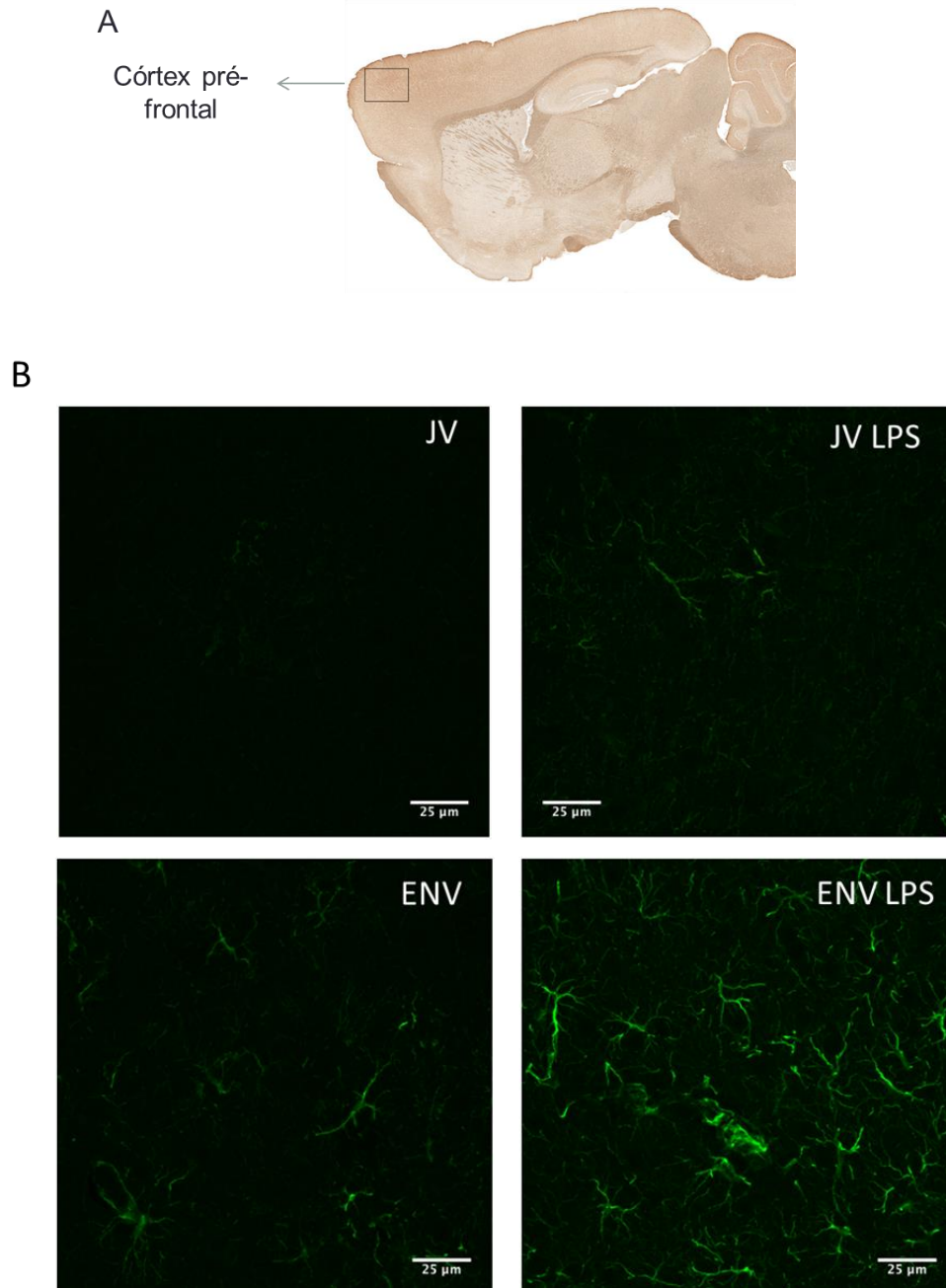


Figura 20. Fotomicrografia representativa da astrogliose no córtex frontal no estado basal e após o desafio inflamatório crônico. Fotomicrografias obtidas em microscópio confocal com aumento de 63x evidenciando a ativação astrocitária (GFAP). Grupos: Jovens (JV), Jovens desafiados com LPS (JV LPS), envelhecidos (ENV) e envelhecidos desafiados com LPS (ENV LPS).

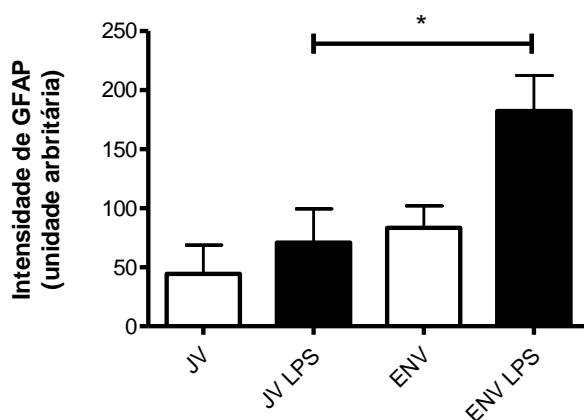


Figura 21. Quantificação da astrogliose. A quantificação da intensidade de GFAP foi aferida pelo programa ImageJ no córtex pré-frontal nos grupos Jovens (JV n=4), Jovens LPS (JV LPS n=4), envelhecidos (ENV n=4) e envelhecidos LPS (ENV n = 4). Efeito significativo: idade * e tratamento *). Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (*p < 0,05).

4.3.2 Ativação de microglia no hipocampo

A avaliação da ativação de microglia foi realizada em três regiões do hipocampo: CA1, CA3 e giro denteado. A figura 22 mostra imagens representativas das alterações morfológicas da microglia no hipocampo. Podemos observar que a microglia dos animais envelhecidos apresente menos número de ramificações e corpo celular maior, com formato mais arredondado caracterizando microglia ativada. Os O desafio inflamatório crônico não demonstrou diferenças quanto a morfologia das microglias.

A quantificação da ativação de microglia foi realizada no modelo agudo e crônico do desafio inflamatório com LPS. A figura 23 mostra que agudamente a microglia dos animais jovens responde com alterações morfológicas características de ativação celular, aumentando a porcentagem de células ativadas. Os animais envelhecidos já apresentam grande quantidade de microglia ativada basalmente, e o desafio com LPS não alterou significativamente este quadro. Já na fase crônica, uma semana após a última injeção de LPS, não foi observado efeito do tratamento nem nos jovens e nem nos envelhecidos. Apenas o efeito da idade foi observado, onde os animais envelhecidos apresentaram maior porcentagem de microglia ativada no estado basal comparados aos animais jovens.

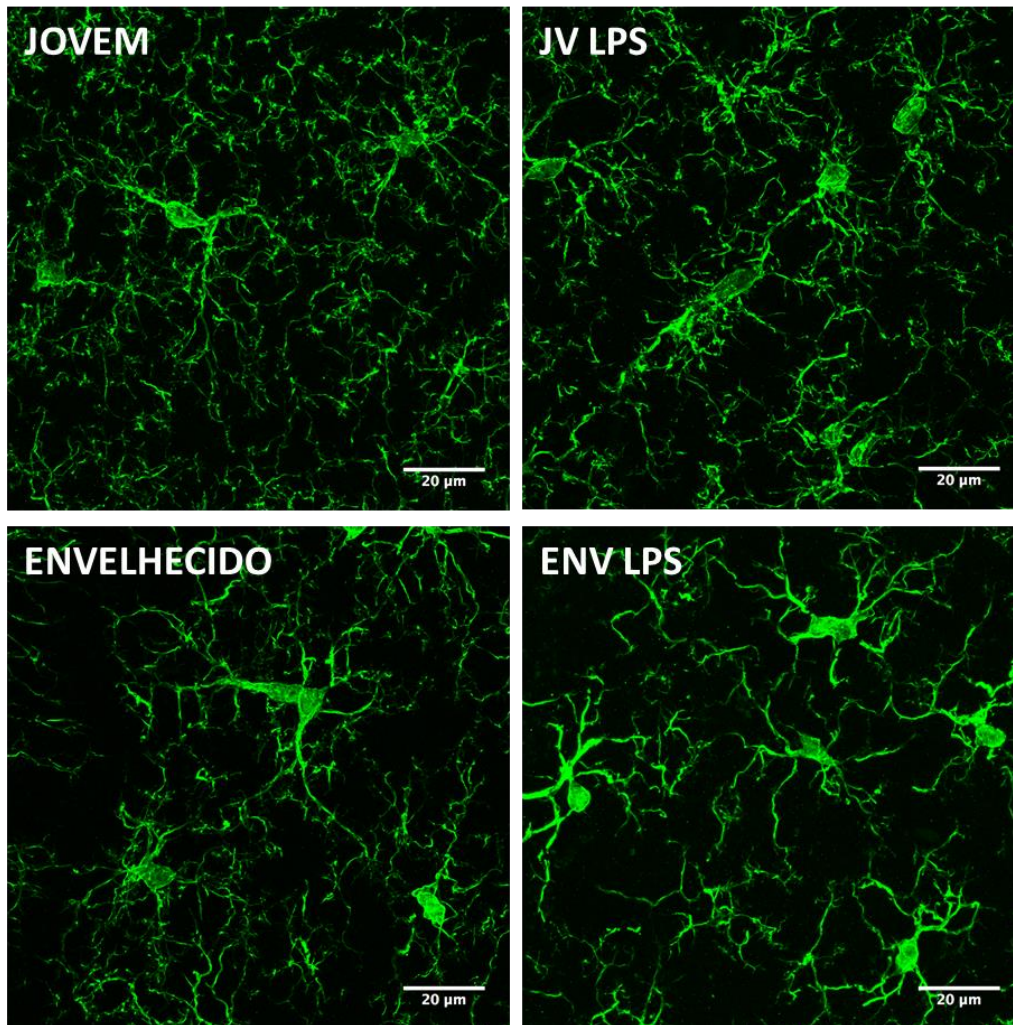


Figura 22. Fotomicrografia representativa das alterações morfológicas da microglia na região CA1 do hipocampo no estado basal e após o desafio inflamatório crônico. Fotomicrografias obtidas em microscópio confocal com aumento de 63x evidenciando a morfologia da microglia (Iba1). Grupos: Jovens (JV), Jovens desafiados com LPS (JV LPS), envelhecidos (ENV) e envelhecidos desafiados com LPS (ENV LPS).

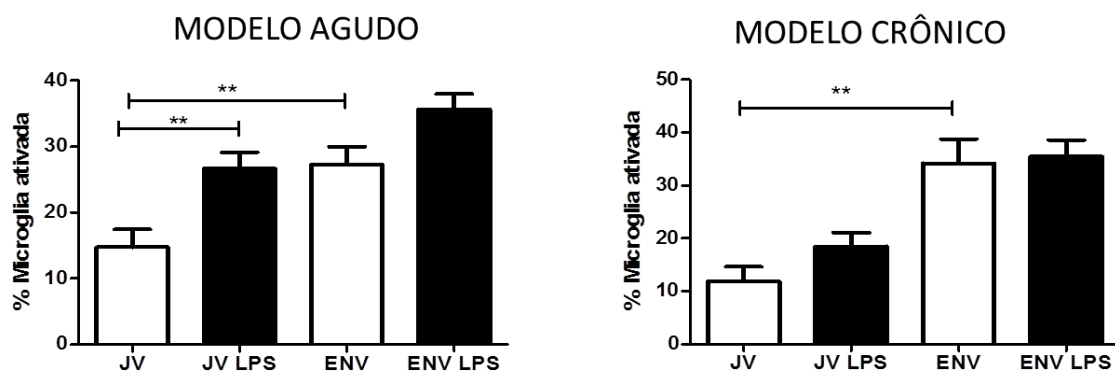


Figura 23. Quantificação da ativação microglial no hipocampo. A quantificação de microglia ativada foi aferida pela porcentagem de células com morfologia hipertrófica na região CA1, CA3 e giro dentado do hipocampo, em animais jovens controle (JV, n=7), jovens tratados com LPS (JV + LPS, n=4), envelhecidos (ENV, n=9) e envelhecidos tratados com LPS (ENV + LPS, n=5). Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (**p < 0,01).

4.3.3. Análise de citocinas no tecido cerebral

A figura 24 representa os níveis cerebrais de citocinas em diferentes tempos no modelo agudo. É possível observar que os animais jovens possuem um aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias IL-1b e IL-6 sete dias após a injeção de LPS, quando comparados com o grupo de jovens controle e aos animais envelhecidos no mesmo tempo. Na análise das citocinas pró-resolutivas, foi possível observar que no tempo de 4 horas os animais jovens possuem uma diminuição dos níveis de IL-10 em comparação ao seu grupo controle e um aumento em comparação aos animais envelhecidos no tempo de 7 dias após a injeção de LPS, não houve diferença significativa nos níveis de IL-4 no cérebro dos animais.

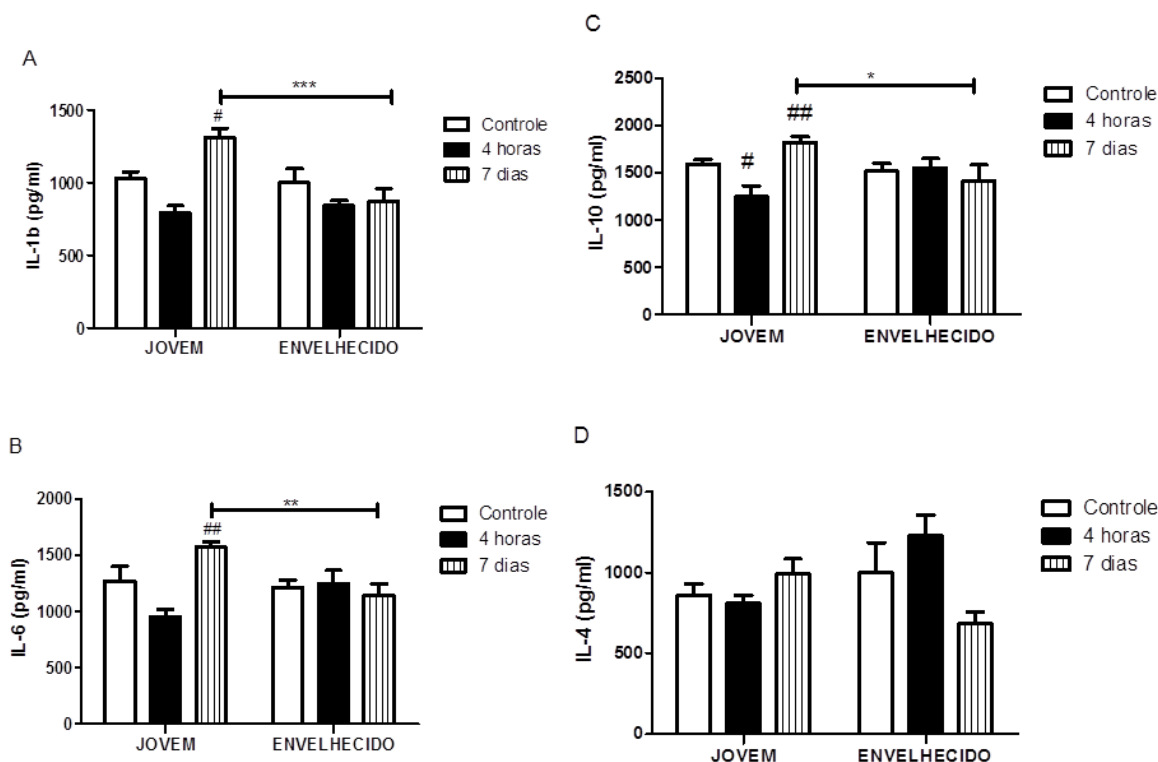


Figura 24. Concentração de citocinas no cérebro em modelo agudo. (A) – Análise de IL-1b feita 4 horas (n= 4 por grupo) e 7 dias (n= 6 por grupo). Efeito significativo: idade *, tratamento ** e interação entre os fatores *; (B) – Análise de IL-6 feita 4 horas (n= 6 por grupo) e 7 dias (n= 6 por grupo). Efeito significativo: interação entre os fatores *; (C) – Análise de IL-10 feita 4 horas (n= 6 por grupo) e 7 dias (n= 6 por grupo). Efeito significativo: interação entre os fatores *; (D) - Análise de IL-4 feita 4 horas (n= 6 por grupo) e 7 dias (n= 6 por grupo). Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (* p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) e teste t (#p<0,05; ##p<0,01).

No modelo crônico (figura 25), não observamos diferenças significativas nos níveis cerebrais das citocinas pró-inflamatórias e pró-resolutivas nos animais jovens, porém, nos animais envelhecidos, houve um aumento destas citocinas 7 dias após a última injeção de LPS quando comparados ao seu grupo controle e aos animais jovens no mesmo tempo. Indicando que, após todo o curso do experimento, os animais envelhecidos permanecem respondendo ao estímulo com LPS, enquanto que os animais jovens não.

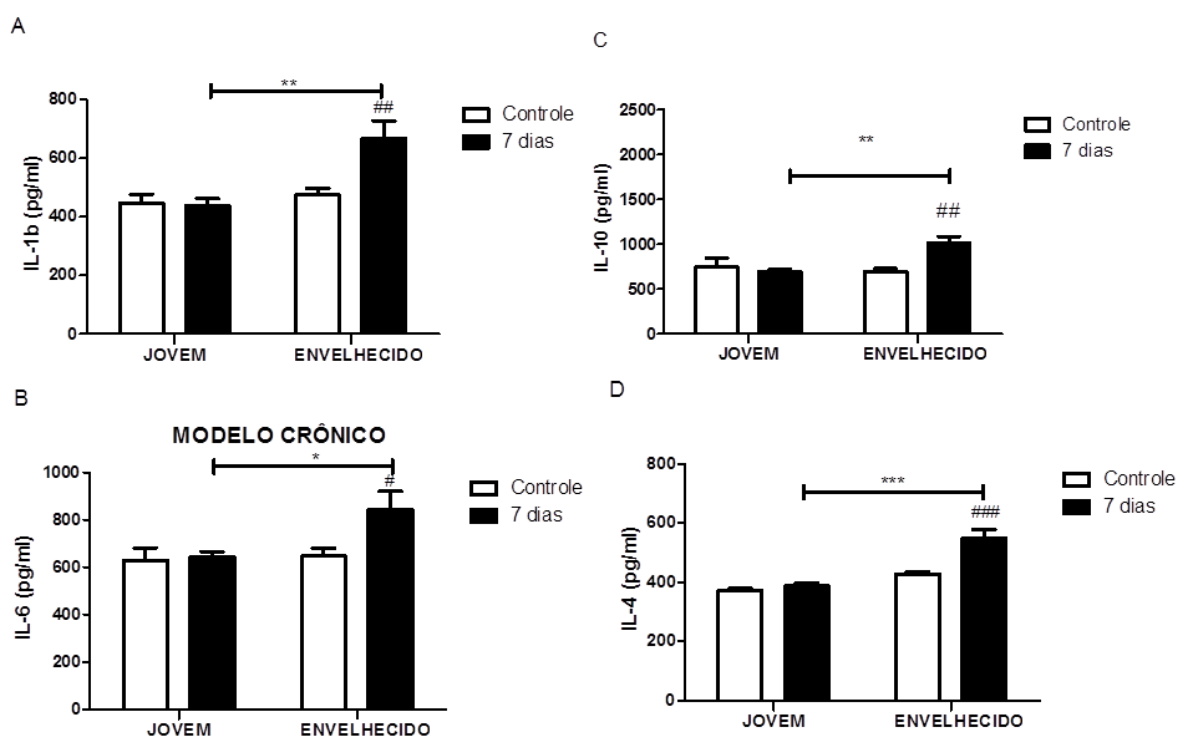


Figura 25 Concentração de citocinas no cérebro em modelo crônico. (A)- Análise de IL-1b feita 7 dias (n=6). Efeito significativo: idade **, tratamento * e interação entre os fatores *; (B) – Análise de IL-6 feita 7 dias (n=6). Efeito significativo: idade *); (C) – Análise de IL-10 feita 7 dias (n=6). Efeito significativo: idade *, tratamento * e interação entre os fatores **; (D) - Análise de IL-4 feita 7 dias (n=6). Efeito significativo: idade ***, tratamento ** e interação entre os fatores *. Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (* p<0,05; **p<0,01) e teste t (#p<0,05; ##p<0,01).

4.4. Mecanismos moleculares do déficit cognitivo

4.4.1. Estresse oxidativo

O 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) é um importante marcador do dano oxidativo à proteínas. Podemos observar através da figura 26 que há uma maior concentração de HNE na região CA1 do hipocampo dos animais envelhecidos após o desafio inflamatório crônico com LPS em comparação com os outros grupos experimentais. A quantificação do HNE foi feita através de Western Blot e é possível observar na figura 27 que há uma tendência (p<0,0561) de aumento da concentração do HNE em animais envelhecidos desafiados com LPS cronicamente. Estes resultados indicam que o nosso modelo crônico induz um maior dano oxidativo nos animais envelhecidos.

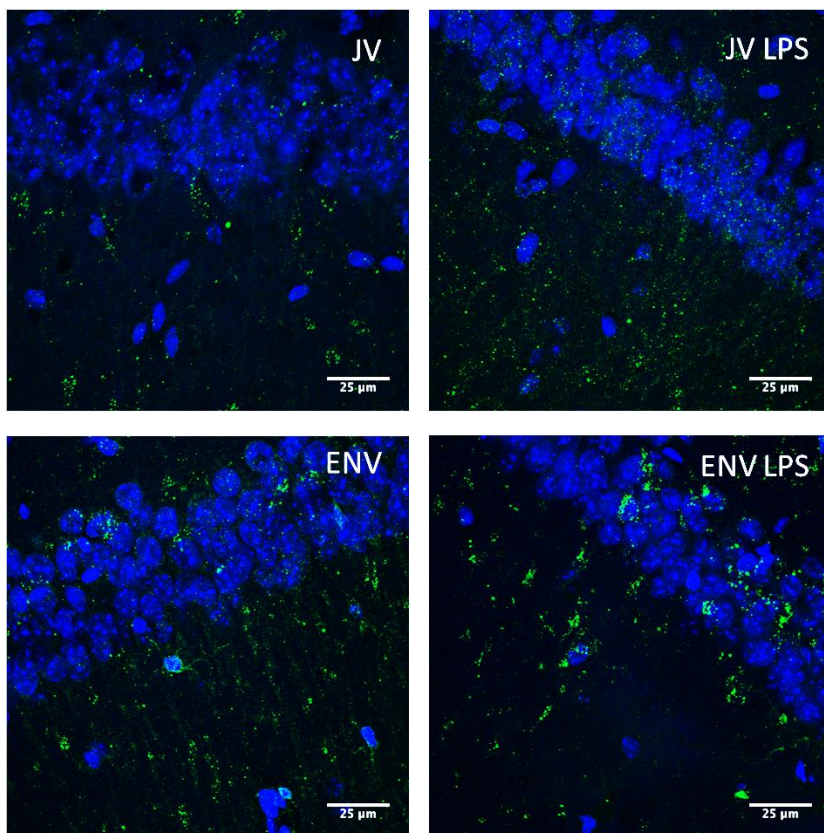


Figura 26. Fotomicrografia representativa da expressão de HNE na região CA1 do hipocampo. Fotomicrografias obtidas em microscópio confocal com aumento de 63x evidenciando a concentração de HNE. Grupos: Jovens (JV), Jovens desafiados com LPS cronicamente (LV + LPS), Envelhecidos (ENV), Envelhecidos desafiados com LPS cronicamente (ENV + LPS).

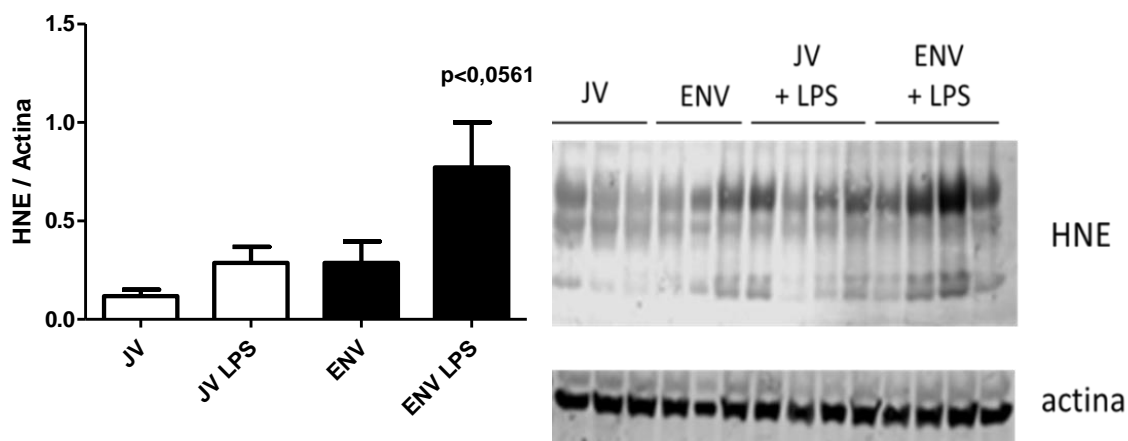


Figura 27. Quantificação do conteúdo de HNE no cérebro dos animais. Homogenatos de cérebro dos animais foram incubados com anticorpo anti-HNE. Grupos: Jovens (JV, n=3), Jovens desafiados com LPS cronicamente (LV + LPS, n=4), Envelhecidos (ENV, n=3), Envelhecidos desafiados com LPS cronicamente (ENV + LPS, n=4) Análise estatística ANOVA de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni.

4.2. Expressão de enzimas antioxidantes

Defesas antioxidantes enzimáticas como superóxido dismutase (SOD) e catalase neutralizam os radicais livres, minimizando seus efeitos. A progressiva desregulação do metabolismo celular ocasiona alterações nos mecanismos de neutralização de ROS, acarretando em um aumento de sua concentração. Na figura 28 é possível observar que os animais envelhecidos apresentam uma tendência de aumento da expressão de SOD (Figura 32A) e diminuição da expressão de CAT (figura 32B) no cérebro.

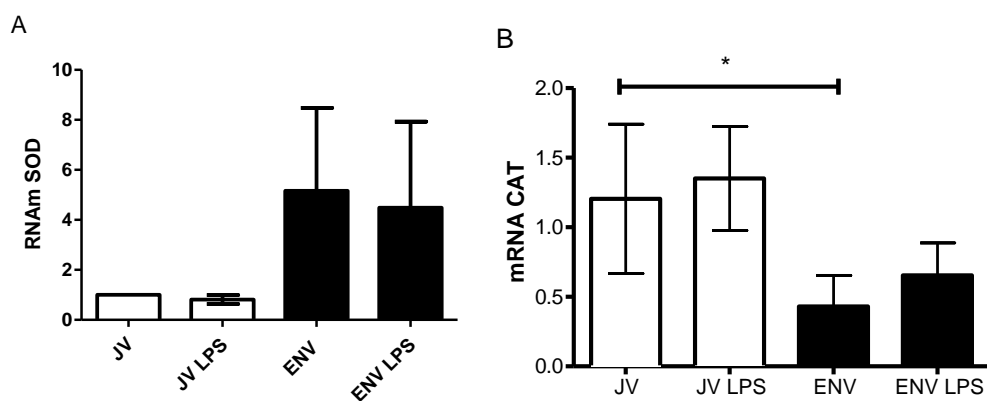


Figura 28. Expressão de RNAm das enzimas antioxidantes no cérebro. (A) Expressão de SOD: Grupos: JV (n=1), JV + LPS (n=3), ENV (n=2), ENV + LPS (n=3). (B) expressão de CAT: Grupos: Jovens (JV; n=3), Jovens modelo crônico (JV + LPS; n=5), Envelhecidos (ENV; n=5), Envelhecidos modelo crônico (ENV + LPS; n=8) crônico (efeito significativo: idade *). Análise estatística Anova de duas vias com comparação pós-teste de Bonferroni (*p< 0,05).

4.4.3. Quantificação de agregados autofluorescentes

A lipofuscina é uma forma especial de agregado autofluorescente, frequentemente observado em diversos tecidos durante o envelhecimento, composto por proteínas, lipídios, vestígios de carboidratos, metais e pigmentos conhecidos como ceróide. Acredita-se que estes agregados induzem citotoxicidade através da produção de ROS. A figura 29 é uma fotomicrografia representativa destes agregados autofluorescentes no córtex cerebral dos camundongos envelhecidos. Estes agregados não estão presentes no cérebro dos camundongos jovens.

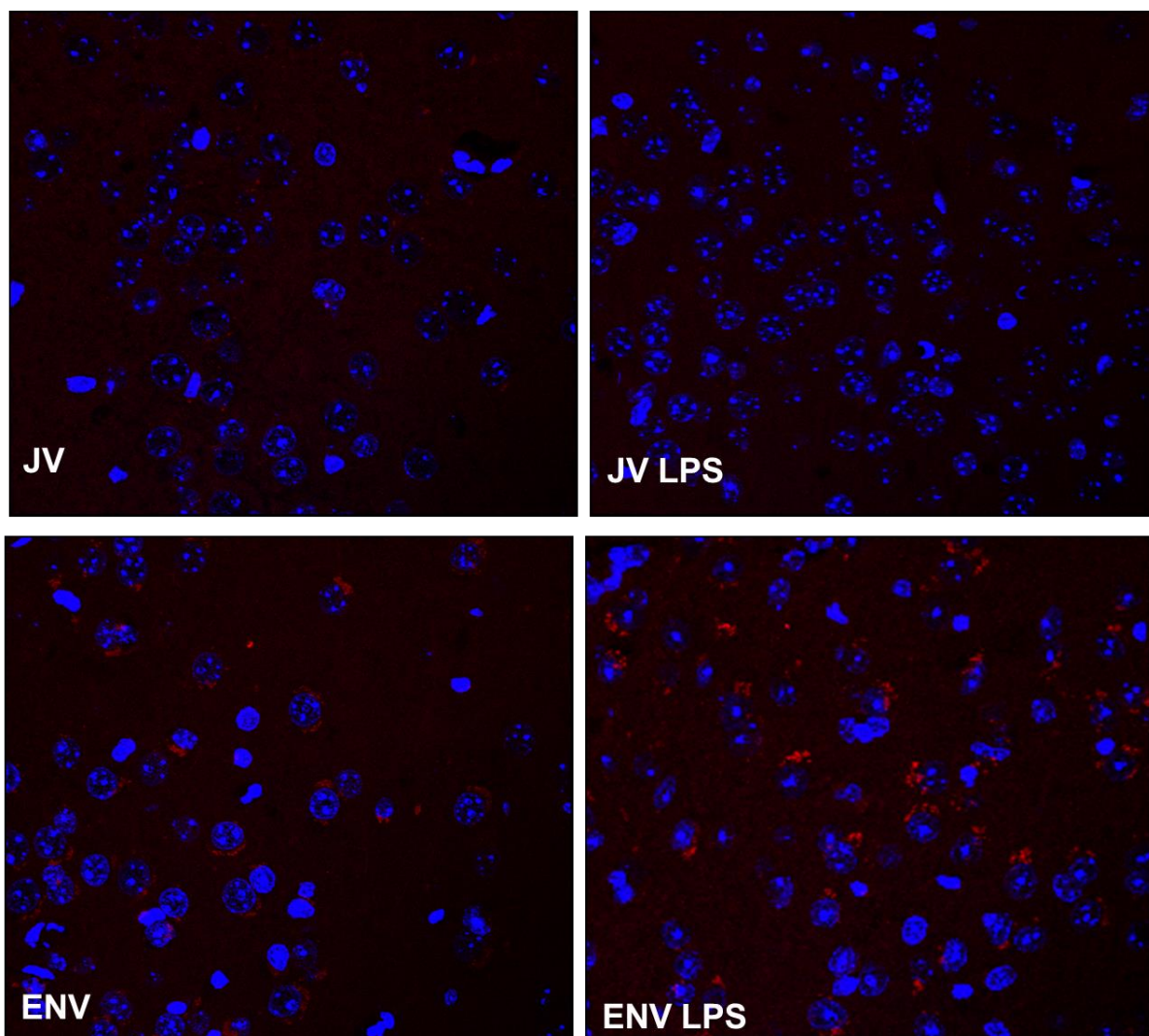


Figura 29. Fotomicrografias representativas da autofluorescência de lipofuscina no córtex cerebral dos camundongos envelhecidos. Fotomicrografias obtidas em microscópio confocal com aumento de 63x evidenciando acúmulo de lipofuscina mais pronunciado no cérebro dos animais envelhecidos aos o modelo crônico de inflamação sistêmica (ENV LPS). Não há agregados autofluorescente nos tecidos dos animais jovens.

Na figura 30 observamos o resultado da análise de quantificação da intensidade de autofluorescência realizadas a partir de fotomicrografias da região do córtex dos animais envelhecidos na fase aguda e crônica após injeção de LPS. É possível observar que os animais envelhecidos desafiados com LPS agudamente possuem uma diminuição na intensidade de fluorescência, em relação ao grupo envelhecido controle. Ao analisarmos os animais desafiados com LPS cronicamente, é possível perceber que há um aumento na intensidade de fluorescência. A análise dos dados indica que a inflamação sistêmica crônica induz um aumento na acumulação de agregados autofluorescentes nos animais envelhecidos.

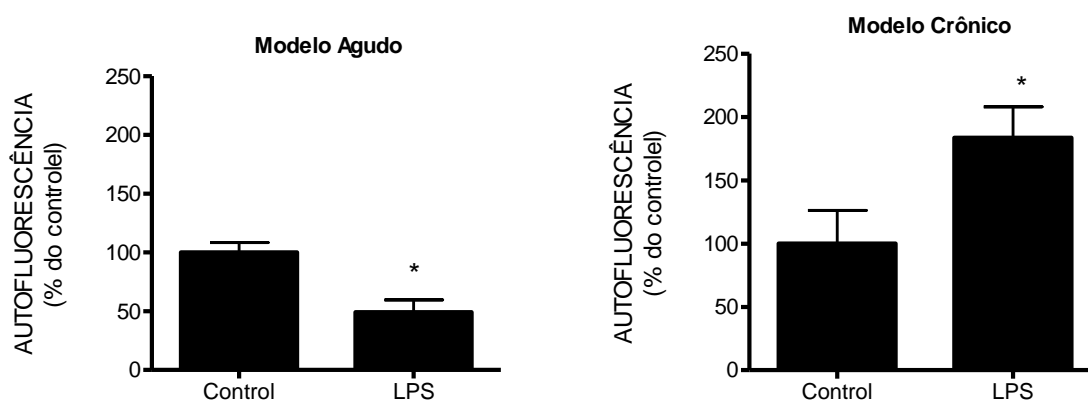


Figura 30. Quantificação da autofluorescência de lipofuscina no córtex cerebral de camundongos envelhecidos. Quantificação da intensidade de fluorescência dos agregados de Lipofuscina a partir de fotomicrografias com aumento de 20x. Análise foi feita com auxílio do programa ImageJ. Análise estatística One sample T test (* $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O envelhecimento é o maior fator de risco para doenças neurodegenerativas. As alterações biológicas que este processo causa no indivíduo, acrescentadas a influências externas, podem gerar ou agravar patologias como, por exemplo, síndromes demenciais. O sistema nervoso é particularmente vulnerável aos danos em resposta à inflamação sistêmica. Estudos mostram que condições inflamatórias sistêmicas em idosos agravam seu quadro de declínio cognitivo (Mcnicoll *et al.*, 2003; Iwashyna *et al.*, 2012). Dada a frequência de infecções e outras condições inflamatórias sistêmicas em indivíduos idosos, é importante que haja modelos adequados para permitir o estudo dos mecanismos do declínio cognitivo associado ao envelhecimento e a inflamações sistêmicas.

Existem na literatura inúmeros modelos agudos de inflamação sistêmica que induzem alterações comportamentais em animais (Chen *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2010; Ming *et al.*, 2015). Nesta tese, caracterizamos um modelo de inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade que não gerasse um quadro de sepse nos animais. A gravidade da inflamação sistêmica foi avaliada na fase aguda por um escore clínico com parâmetros característicos do quadro infeccioso, e demonstrou ausência de sintomas graves no modelo experimental desenvolvido. A importância deste modelo é enfatizada pelo fato do déficit de memória ter sido observado apenas em animais envelhecidos, indicando uma maior suscetibilidade destes animais aos efeitos da inflamação sistêmica. O modelo caracterizado neste trabalho permite a análise dos mecanismos de déficit cognitivo de forma dependente da idade.

Muitos aspectos da imunidade inata são afetados pela idade. As mudanças que ocorrem no sistema imune inato podem envolver ganho ou perda de funções. Em modelos de envelhecimento com inflamação pulmonar, neutrófilos exibiram uma capacidade inflamatória alterada com redução da função citotóxica e consequente prolongamento da infecção (Nomellini *et al.*, 2008). Em nosso modelo crônico de inflamação sistêmica, observamos aumento exacerbado de células polimorfonucleares (majoritariamente neutrófilos) nos animais envelhecidos, com pico em 24 horas após a injeção de LPS (figura 13). Nossos resultados corroboram estudos em modelo animal de pneumonia, onde camundongos envelhecidos possuem níveis aumentados da quimiocina KC, que promove quimiotaxia de neutrófilos, e contagem de neutrófilos aumentada 24 horas após a infecção (Chen *et al.*, 2014). A exacerbação da contagem de neutrófilos pode estar relacionada à redução de suas funções, podendo ocasionar injúria tecidual e aumentar o risco de infecções durante o envelhecimento.

Em nosso modelo, mostramos que o desafio crônico de LPS interferiu nos níveis de citocinas diferentemente, dependendo da idade e da fase da resposta inflamatória. No modelo agudo, os animais jovens apresentaram aumento de IL-6, o que indica uma resposta pró-inflamatória normal desencadeada pela injeção de LPS. Os animais envelhecidos não apresentaram aumento de IL-6 no sangue agudamente após a injeção de LPS, sugerindo que estes animais apresentam um déficit na resposta inata. Na segunda fase do modelo agudo (7 dias após a injeção de LPS) observamos que os animais envelhecidos apresentaram níveis elevados de IL-1b (figura 15) e diminuição de IL-4 (figura 18) no sangue, indicando que a resposta pró-inflamatória exacerbada pode estar associada a uma falha nos mecanismos de resolução da resposta inflamatória nos animais envelhecidos (Figura 35).

No modelo crônico, os jovens apresentaram aumento de IL-10 e IL-4 (figura 17 e 18), indicando uma resposta pró-resolutiva frente ao desafio crônico. Já os animais envelhecidos apresentaram uma diminuição de IL-4 neste modelo, indicando uma desregulação na resposta anti-inflamatória persistente que pode estar associada a uma falha da resolução da inflamação sistêmica no modelo crônico (Figura 35). Esta desregulação da resposta inflamatória sistêmica determina níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias que, quando persistentes podem induzir neuroinflamação.

Diversos estudos mostram que defeitos em sistemas regulatórios estão relacionados á resposta exagerada da microglia (Jurgens e Johnson, 2012; Norden e Godbout, 2013), o que está de acordo com nossos resultados de citocinas cerebrais. No cérebro, os animais jovens apresentaram aumento de IL-1b, IL-6 e IL-10 (figura 26, 27 e 28) no modelo agudo, mas no modelo crônico não houve aumento destas citocinas, indicando resolução eficiente do processo inflamatório no cérebro dos animais jovens. Os animais envelhecidos não apresentaram alterações nos níveis de citocinas cerebrais no modelo agudo, mas cronicamente houve aumento de todas as citocinas avaliadas (figura 35). Esses resultados corroboram dados da literatura, que mostram ativação prolongada da microglia e indução de prejuízos cognitivos mesmo com aumento de IL-10 (Chen *et al.*, 2008; Godbout *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008). Isto indica que a resposta inflamatória dos animais envelhecidos está desregulada tanto sistemicamente quanto a nível cerebral, está presente no modelo agudo e permanece no modelo crônico.

AGUDO	Jovem	Envelhecido
Sangue	↑ IL-6	↑ IL-1b; ↓ IL-4
Cérebro	↑ IL-10, IL-6, IL-4	Sem alterações
CRÔNICO	Jovem	Envelhecido
Sangue	↑ IL-10, IL-4	↓ IL-4
Cérebro	Sem alterações	↑ IL-10, IL-6, IL-4, IL-1b

Figura 31. Resumo das alterações das citocinas analisadas no presente trabalho.

A ativação do sistema imune pode modificar inúmeros processos fisiológicos como aprendizado e memória (Dantzer, 2004; Dantzer *et al.*, 2011). Chen e colaboradores mostraram que uma única injeção aguda de LPS produz prejuízos na memória espacial de camundongos idosos (Chen *et al.*, 2008). Além disso, a infecção por *E. coli* reduz a memória contextual de longa duração em ratos idosos (Barrientos *et al.*, 2009). A indução de uma inflamação sistêmica aguda gera déficits cognitivos transientes, que fazem parte do

comportamento conhecido como “*sickness behaviour*”. Nesta tese, buscamos analisar os prejuízos cognitivos de longo prazo no envelhecimento e a influência da inflamação sistêmica neste processo. Para avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais, visando excluir possíveis vieses em nossos testes de comportamento, estes foram submetidos ao teste de habituação ao campo aberto. Neste teste, foi possível observar que os animais envelhecidos possuem uma diminuição no número de *rearings* e *crossings*, indicando que estes animais apresentam uma diminuição na sua atividade locomotora, em comparação aos animais jovens. Neste caso, não foi possível realizar comparações entre grupos de diferentes idades nos testes comportamentais de atividades locomotoras em campo aberto. O tratamento com LPS não afetou o número de *rearings* e *crossing* ou a habituação em nenhum grupo experimental, indicando que nosso modelo de injeção de LPS não induziu problemas de locomoção ou atividade exploratória dos animais (Figura 17).

As avaliações de memória de curta e longa duração foram feitas uma semana após a última injeção de LPS para avaliar os efeitos de longo prazo da inflamação sistêmica, e não os efeitos agudos. Foi utilizado o teste de reconhecimento de objetos para avaliar a memória de curta duração dos animais onde observamos que os animais jovens, mesmo quando desafiados com LPS, não apresentaram prejuízos cognitivos. Ao avaliarmos os animais envelhecidos, observamos que estes apresentaram o mesmo padrão de exploração que os animais jovens, mas o modelo crônico gerou um déficit na memória de curta duração dos animais envelhecidos (Figura 18). O Labirinto Aquático de Morris foi utilizado para avaliar a memória espacial dos animais. Os resultados deste teste mostraram que os animais não possuem diferenças na velocidade média de nado. Ao analisarmos o tempo de nado após o treinamento, na ausência da plataforma, percebemos que os animais envelhecidos desafiados com nosso modelo de inflamação sistêmica crônica apresentaram tempo de nado diminuído no quadrante em que se encontrava a plataforma. Os mecanismos moleculares das alterações comportamentais induzidas pela inflamação sistêmica ainda não são bem compreendidos, mas na literatura há estudos relacionando a neuroinflamação e o estresse oxidativo a déficits cognitivos em modelos de inflamação sistêmica (Bozza *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2015).

Espécies reativas de oxigênio são produzidas pelos fagócitos em virtude da necessidade de erradicar os patógenos invasores, mas também podem provocar a oxidação de cadeias de ácidos graxos polinsaturados, processo conhecido como peroxidação lipídica (Boueiz, A, 2009). O HNE é um produto da peroxidação lipídica que se liga covalentemente a proteínas, podendo ser dosado como um marcador de estresse oxidativo tecidual. Em nossas

análises imunohistoquímicas observamos o acúmulo de HNE no hipocampo dos animais envelhecidos após o desafio inflamatório. A quantificação de HNE feita por Western Blotting revelou aumento do conteúdo de HNE no cérebro dos animais envelhecidos após o desafio inflamatório crônico (Figura 26 e 27). O estresse oxidativo é um importante mecanismo de citotoxicidade em diversas condições patológicas, e no nosso modelo experimental pode estar associado a neurotoxicidade e indução do prejuízo cognitivo observado nos animais envelhecidos. Outros estudos mostram que o estresse oxidativo pode agravar os prejuízos causados pelas doenças neurodegenerativas (Federico *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Zhao e Zhao, 2013).

Mudanças nos mecanismos antioxidantes durante o envelhecimento já foram reportados em diversos trabalhos (Hauser e Hastings, 2013; Sesti, 2016). Um dos mecanismos moleculares do estresse oxidativo é o desbalanço nos níveis de defesas antioxidantes. Ao analisarmos a expressão das enzimas antioxidantes SOD e CAT em nosso modelo experimental, encontramos uma tendência de aumento na expressão de SOD e diminuição na expressão de CAT no cérebro dos animais envelhecidos (Figura 28). O tratamento crônico com LPS não alterou a expressão destas enzimas antioxidantes, porém, a atividade destas enzimas pode estar alterada pelo tratamento com LPS. O possível aumento da expressão de SOD associado à diminuição da expressão de CAT pode determinar um acúmulo de peróxido de hidrogênio no cérebro dos animais envelhecidos, e este pode ser um dos mecanismos moleculares do estresse oxidativo observado no cérebro dos animais envelhecidos.

Foi documentado que o estresse oxidativo causado pela microglia tem efeitos tóxicos nos neurônios (Qin *et al.*, 2004). As microglias são ativadas por mecanismos patogênicos e estímulos exógenos para desempenhar funções de controle da infecção e inflamação (Wake *et al.*, 2011). Entretanto, a ativação crônica da microglia em infecções sistêmicas recorrentes pode gerar dano neuronal. A ativação da microglia aparenta estar envolvida no dano ao SNC durante a esclerose múltipla e a redução de sua atividade diminui a gravidade da doença (Zindler e Zipp, 2010). Dada a importância destas células nos processos de resposta imunológica e declínio cognitivo, fomos avaliar o perfil de ativação destas células no nosso modelo de estudo. Nossos resultados corroboram outros dados da literatura, em que a microglia de animais envelhecidos apresenta morfologia característica de célula ativada ou distrófica, com diminuição de ramificações e aumento do corpo celular, quando comparados com animais jovens (figura 25)(Choi *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008). Como o nível basal de

ativação é bastante alto, este pode ser um dos motivos pelo qual não percebemos aumento na ativação de microglia após o desafio crônico com LPS.

Citocinas como IL-1 β são produzidas pelas microglias ativadas e possuem papel essencial na indução e manutenção do “sickness behaviour” (Dantzer, 2001). A estimulação aguda da hiperativação de microglia resulta em uma produção exagerada de IL-1 β , IL -6 e TNF α nos animais idosos, em relação aos adultos (Frank *et al.*, 2010; Morandi *et al.*, 2011), Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que o estímulo com LPS induz o aumento da produção de IL-1b e IL-6 (Ye e Johnson, 2001; Xie *et al.*, 2003; Godbout *et al.*, 2005). Em nossos resultados não observamos alterações estatísticas, o que pode ser explicado pelos tempos utilizados em nosso modelo. Um estudo recente do nosso grupo mostrou que a inflamação sistêmica no modelo experimental de sepse induz perda sináptica mediada pela secreção de IL-b da microglia, e tal fato pode estar associado ao declínio cognitivo encontrado neste modelo experimental (Moraes *et al.*, 2015).

A microglia pode apresentar prejuízos funcionais em modelos animais de envelhecimento e neurodegeneração. Por exemplo, em um modelo de Doença de Alzheimer, a microglia dos camundongos envelhecidos apresenta fagocitose reduzida de beta-amiloide (Hickman *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). Em camundongos idosos com injúria de retina, a microglia também responde mais vagarosamente e mostra um acúmulo prolongado no local de injúria, quando comparado com camundongos adultos (Damani *et al.*, 2011). Essas deficiências funcionais podem ser consideradas indicadores de senescência microglial, onde as microglias, chamadas de microglias distróficas, apresentam morfologia anormal e são consideradas não saudáveis. Nossos dados mostram que os animais envelhecidos possuem microglias distróficas, demonstrado pelas alterações secretórias características de uma disfunção microglial (com prolongamento de secreção de citocinas), que pode estar associada a falhas no processo de resolução da inflamação e prolongamento de um ambiente pró-inflamatório cerebral. Diferentemente do animal jovem, o animal envelhecido apresenta microglia permanentemente ativada durante todo o curso do modelo crônico de inflamação sistêmica. Estudos mostram que a ausência de resolução da resposta inflamatória a nível cerebral pode causar distúrbios cognitivos em camundongos (Godbout *et al.*, 2008; Czerniawski e Guzowski, 2014), o que também foi visto em nosso trabalho.

Uma característica da senescência celular é a presença de agregados de lipofuscina, uma mistura de pigmentos lipídicos e de proteínas que se acumulam no lisossoma e não são degradados (Gray e Woulfe, 2005; Seehafer e Pearce, 2006). A desregulação no transporte e

na degradação de macromoléculas é um possível mecanismo de acumulação de lipofuscina. A degradação lisossomal de componentes citosólicos na célula é denominada autofagia. Estudos anteriores mostram que a senescência celular causa uma disfunção autofágica. A degradação total de proteínas diminui em vários modelos de envelhecimento (Seglen e Bohley, 1992). A degradação destas moléculas potencialmente citotóxicas pode proteger os neurônios (Amano *et al.*, 1995), mas o papel patológico do acúmulo dessas substâncias não está claro. Um estudo recente mostrou que os agregados de lipofuscina surgem a partir de restos da membrana de mielina e que há um aumento no número e no volume de grânulos de lipofuscina na microglia durante o envelhecimento (Safaiyan *et al.*, 2016). Os dados do presente trabalho demonstram que há uma diminuição do conteúdo de lipofuscina nos animais envelhecidos desafiados com LPS agudamente, indicando que uma ativação microglial aguda pode estar associada ao aumento do *clearance* de lipofuscina; já nos animais desafiados com LPS cronicamente, houve um aumento do conteúdo destes agregados fluorescentes em comparação aos animais envelhecidos controle. Estes dados sugerem que a ativação da microglia induzida pelo LPS agudamente está associada ao *clearance* tecidual, enquanto que a disfunção microglial induzida pelo tratamento crônico com baixas doses de LPS está associada ao acúmulo de lipofuscina no cérebro dos animais envelhecidos.

Os dados obtidos no presente trabalho podem ajudar no entendimento dos mecanismos que levam a uma disfunção cognitiva no processo inflamatório crônico, contribuindo para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento.

6. CONCLUSÃO

- O modelo experimental estabelecido não ocasionou mudanças de peso ou no escore clínico dos animais;
- Os animais envelhecidos apresentaram aumento exacerbado de leucócitos e desregulação na secreção de citocinas, tanto no modelo agudo quanto no modelo crônico em diversos tempos;
- O modelo experimental crônico causou astrogliose significativa e aumento de citocinas pro e anti-inflamatórias apenas no SNC dos animais envelhecidos;
- O desempenho cognitivo dos camundongos envelhecidos submetidos ao modelo experimental crônico foi reduzido, tanto no teste de reconhecimento de objetos quanto no Labirinto aquático de Morris;

- O modelo experimental crônico tende a induzir aumento de HNE apenas nos animais envelhecidos e aumento de agregados autofluorescentes no córtex destes animais.

4. REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.; SOHAL, R. S. Aging and protein oxidative damage. *Mech Ageing Dev*, v. 75, n. 1, p. 11-9, Jul 1994. ISSN 0047-6374 (Print)

0047-6374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9128750> >.

AMANO, T. et al. Age-related changes in cellular localization and enzymatic activities of cathepsins B, L and D in the rat trigeminal ganglion neuron. *Mech Ageing Dev*, v. 83, n. 3, p. 133-41, Sep 15 1995. ISSN 0047-6374 (Print)

0047-6374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8583832> >.

BAJRAMOVIC, J. J. Regulation of innate immune responses in the central nervous system. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, v. 10, n. 1, p. 4-24, Feb 2011. ISSN 1996-3181 (Electronic)

1871-5273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143142> >.

BANKS, W. A. The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. *Neurol Clin*, v. 24, n. 3, p. 413-9, Aug 2006. ISSN 0733-8619 (Print)

0733-8619 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16877115> >.

BANKS, W. A. et al. Intravenous human interleukin-1alpha impairs memory processing in mice: dependence on blood-brain barrier transport into posterior division of the septum. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 299, n. 2, p. 536-41, Nov 2001. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602664> >.

BARICHELLO, T. et al. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med*, v. 35, n. 9, p. 2186-90, Sep 2007. ISSN 0090-3493 (Print)

0090-3493 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855835> >.

BARRIENTOS, R. M. et al. Characterization of the sickness response in young and aging rats following *E. coli* infection. *Brain Behav Immun*, v. 23, n. 4, p. 450-4, May 2009. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486645> >.

BECKMAN, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, n. 4, p. 1620-4, Feb 1990. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154753> >.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, v. 87, n. 1, p. 245-313, Jan 2007. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237347> >.

BERLESE, D. B. et al. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem*, v. 83, n. 1, p. 48-53, Jan 2005. ISSN 1074-7427 (Print)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607688> >.

BLAYLOCK, R. L. Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part 2: Innate brain immunity. *Surg Neurol Int*, v. 4, p. 118, 2013. ISSN 2229-5097 (Print)

2152-7806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083053> >.

BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 39, n. 1, p. 3-18, Feb 2013. ISSN 1365-2990 (Electronic)

0305-1846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23252647> >.

BOZZA, F. A. et al. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock*, v. 39 Suppl 1, p. 10-6, May 2013. ISSN 1540-0514 (Electronic)

1073-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481496> >.

BOZZA, F. A. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*, v. 11, n. 2, p. R49, 2007. ISSN 1466-609X (Electronic)

1364-8535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448250> >.

BRUNK, U. T.; TERMAN, A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*, v. 33, n. 5, p. 611-9, Sep 1 2002. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208347> >.

BRUUNSGAARD, H. et al. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 54, n. 7, p. M357-64, Jul 1999. ISSN 1079-5006 (Print)

1079-5006 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462168> >.

BRUUNSGAARD, H.; PEDERSEN, B. K. [The senile immune system]. *Ugeskr Laeger*, v. 161, n. 34, p. 4740-3, Aug 23 1999. ISSN 0041-5782 (Print)

0041-5782 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500461> >.

BUTTERFIELD, D. A.; BADER LANGE, M. L.; SULTANA, R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, v. 1801, n. 8, p. 924-9, Aug 2010. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176130> >.

CAMPISI, J.; ROBERT, L. Cell senescence: role in aging and age-related diseases. *Interdiscip Top Gerontol*, v. 39, p. 45-61, 2014. ISSN 1662-3800 (Electronic)

0074-1132 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24862014> >.

CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. *Front Biosci (Schol Ed)*, v. 3, p. 52-60, 2011. ISSN 1945-0524 (Electronic)

1945-0516 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196356> >.

CHEN, J. et al. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav Immun*, v. 22, n. 3, p. 301-11, Mar 2008. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951027> >.

CHEN, M. M. et al. Age-related differences in the neutrophil response to pulmonary pseudomonas infection. *Exp Gerontol*, v. 54, p. 42-6, Jun 2014. ISSN 1873-6815 (Electronic)

0531-5565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398045> >.

CHOI, J. H. et al. Age-related changes in ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity and protein level in the gerbil hippocampal CA1 region. *J Vet Med Sci*, v. 69, n. 11, p. 1131-6, Nov 2007. ISSN 0916-7250 (Print)

0916-7250 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18057827> >.

CLARKE, J. R. et al. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 6, p. 2652-7, Feb 9 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133798> >.

COMBRINCK, M. I.; PERRY, V. H.; CUNNINGHAM, C. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience*, v. 112, n. 1, p. 7-11, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044467> >.

CZERNIAWSKI, J.; GUZOWSKI, J. F. Acute neuroinflammation impairs context discrimination memory and disrupts pattern separation processes in hippocampus. *J Neurosci*, v. 34, n. 37, p. 12470-80, Sep 10 2014. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209285> >.

CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. Autonomic neural regulation of immunity. *J Intern Med*, v. 257, n. 2, p. 156-66, Feb 2005. ISSN 0954-6820 (Print)

0954-6820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15656874> >.

DAMANI, M. R. et al. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell*, v. 10, n. 2, p. 263-76, Apr 2011. ISSN 1474-9726 (Electronic)

1474-9718 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21108733> >.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci*, v. 933, p. 222-34, Mar 2001. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000023> >.

_____. Innate immunity at the forefront of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun*, v. 18, n. 1, p. 1-6, Jan 2004. ISSN 0889-1591 (Print)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651940> >.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, v. 9, n. 1, p. 46-56, Jan 2008. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073775> >.

DANTZER, R. et al. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology*, v. 36, n. 3, p. 426-36, Apr 2011. ISSN 1873-3360 (Electronic)

0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041030> >.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, v. 8, n. 6, p. 752-8, Jun 2005. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15895084> >.

DHEEN, S. T.; KAUR, C.; LING, E. A. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem*, v. 14, n. 11, p. 1189-97, 2007. ISSN 0929-8673 (Print)

0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504139> >.

DIENER, K. R. et al. The multifunctional alarmin HMGB1 with roles in the pathophysiology of sepsis and cancer. *Immunol Cell Biol*, v. 91, n. 7, p. 443-50, Aug 2013. ISSN 1440-1711 (Electronic)

0818-9641 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797067> >.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, v. 54, n. 1, p. 15-36, May 1993. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515840> >.

ENG, L. F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol*, v. 8, n. 4-6, p. 203-14, Jun 1985. ISSN 0165-5728 (Print)

0165-5728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2409105> >.

FARFARA, D.; LIFSHITZ, V.; FRENKEL, D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, v. 12, n. 3, p. 762-80, Jun 2008. ISSN 1582-1838 (Print)

1582-1838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18363841> >.

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*, v. 28, n. 3, p. 138-45, Mar 2007. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276138> >.

FEDERICO, A. et al. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci*, v. 322, n. 1-2, p. 254-62, Nov 15 2012. ISSN 1878-5883 (Electronic)

0022-510X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22669122> >.

FERRI, A. et al. Cell death in amyotrophic lateral sclerosis: interplay between neuronal and glial cells. *FASEB J*, v. 18, n. 11, p. 1261-3, Aug 2004. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208263> >.

FLANARY, B. E. et al. Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Res*, v. 10, n. 1, p. 61-74, Mar 2007. ISSN 1549-1684 (Print)

1549-1684 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17378753> >.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, v. 908, p. 244-54, Jun 2000. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911963> >.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 69 Suppl 1, p. S4-9, Jun 2014. ISSN 1758-535X (Electronic)

1079-5006 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833586> >.

FRANK, M. G. et al. IL-1RA blocks E. coli-induced suppression of Arc and long-term memory in aged F344xBN F1 rats. *Brain Behav Immun*, v. 24, n. 2, p. 254-62, Feb 2010. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822205> >.

FULTON, D. et al. A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur J Neurosci*, v. 21, n. 5, p. 1347-58, Mar 2005. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15813944> >.

GIUNTA, S. Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? *Immun Ageing*, v. 3, p. 12, 2006. ISSN 1742-4933 (Electronic)

1742-4933 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17173699> >.

GIUSTARINI, D. et al. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*, v. 46, n. 5-6, p. 241-81, 2009. ISSN 1549-781X (Electronic)

1040-8363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19958214> >.

GLASER, V. et al. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell Mol Neurobiol*, v. 30, n. 7, p. 1067-75, Oct 2010. ISSN 1573-6830 (Electronic)

0272-4340 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20582463> >.

GODBOUT, J. P. et al. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J*, v. 19, n. 10, p. 1329-31, Aug 2005. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919760> >.

GODBOUT, J. P. et al. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 10, p. 2341-51, Sep 2008. ISSN 1740-634X (Electronic)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18075491> >.

GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, v. 119, n. 1, p. 89-105, Jan 2010. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012873> >.

GRAY, D. A.; WOULFE, J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Sci Aging Knowledge Environ*, v. 2005, n. 5, p. re1, Feb 2 2005. ISSN 1539-6150 (Electronic)

1539-6150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15689603> >.

GREEN, J. D. The Hippocampus. *Physiol Rev*, v. 44, p. 561-608, Oct 1964. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14221342> >.

GUILLAMON-VIVANCOS, T.; GOMEZ-PINEDO, U.; MATIAS-GUIU, J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia*, v. 30, n. 2, p. 119-29, Mar 2015. ISSN 1578-1968 (Electronic)

0213-4853 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23465689> >.

GUO, C. et al. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*, v. 8, n. 21, p. 2003-14, Jul 25 2013. ISSN 1673-5374 (Print)

1673-5374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25206509> >.

GUO, Y. et al. Astrocytic pathology in the immune-mediated motor neuron injury. *Amyotroph Lateral Scler*, v. 8, n. 4, p. 230-4, Aug 2007. ISSN 1748-2968 (Print)

1471-180X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653921> >.

HALLIDAY, G. et al. Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 27, n. 1-2, p. 1-8, Jan-Feb 2000. ISSN 0305-1870 (Print)

0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696521> >.

HAMANN, S. Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. *Trends Cogn Sci*, v. 5, n. 9, p. 394-400, Sep 1 2001. ISSN 1879-307X (Electronic)

1364-6613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520704> >.

HANSEN, J. D.; VOJTECH, L. N.; LAING, K. J. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev Comp Immunol*, v. 35, n. 9, p. 886-97, Sep 2011. ISSN 1879-0089 (Electronic)

0145-305X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241729> >.

HART, A. D. et al. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. *Brain Behav Immun*, v. 26, n. 5, p. 754-65, Jul 2012. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155499> >.

HAUSER, D. N.; HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis*, v. 51, p. 35-42, Mar 2013. ISSN 1095-953X (Electronic)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064436> >.

HAYAKAWA, T. et al. Levels in stroke patients of CSF astroprotein, an astrocyte-specific cerebroprotein. *Stroke*, v. 10, n. 6, p. 685-9, Nov-Dec 1979. ISSN 0039-2499 (Print)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/524409> >.

HERNANDES, M. S. et al. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *J Neuroinflammation*, v. 11, p. 36, 2014. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24571599> >.

HICKMAN, S. E.; ALLISON, E. K.; EL KHOURY, J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*, v. 28, n. 33, p. 8354-60, Aug 13 2008. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701698> >.

HIRAI, K. et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, v. 21, n. 9, p. 3017-23, May 1 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312286> >.

HOEPPNER, D. J.; HENGARTNER, M. O.; SCHNABEL, R. Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 412, n. 6843, p. 202-6, Jul 12 2001. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449279> >.

HUANG, Y. et al. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiol Aging*, v. 29, n. 11, p. 1744-53, Nov 2008. ISSN 1558-1497 (Electronic)

0197-4580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17543422> >.

HUI, L. Aging and chronic disease as independent causative factors for death and a programmed onset for chronic disease. *Arch Gerontol Geriatr*, v. 60, n. 1, p. 178-82, Jan-Feb 2015. ISSN 1872-6976 (Electronic)

0167-4943 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25465502> >.

IWASHYNA, T. J. et al. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J Am Geriatr Soc*, v. 60, n. 6, p. 1070-7, Jun 2012. ISSN 1532-5415 (Electronic)

0002-8614 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22642542> >.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol*, v. 51, n. 2, p. 171-202, Mar 1989. ISSN 0163-1047 (Print)

0163-1047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2564771> >.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997. ISSN 1074-7427 (Print)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398590> >.

JANIG, W.; GREEN, P. G. Acute inflammation in the joint: its control by the sympathetic nervous system and by neuroendocrine systems. *Auton Neurosci*, v. 182, p. 42-54, May 2014. ISSN 1872-7484 (Electronic)

1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530113> >.

JURGENS, H. A.; JOHNSON, R. W. Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol*, v. 233, n. 1, p. 40-8, Jan 2012. ISSN 1090-2430 (Electronic)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21110971> >.

KENTROS, C. G. et al. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. *Neuron*, v. 42, n. 2, p. 283-95, Apr 22 2004. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15091343> >.

KIMELBERG, H. K. Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol*, v. 3, n. 1, p. 1-16, Mar 1983. ISSN 0272-4340 (Print)

0272-4340 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6136326> >.

KOPATZ, J. et al. Siglec-h on activated microglia for recognition and engulfment of glioma cells. *Glia*, v. 61, n. 7, p. 1122-33, Jul 2013. ISSN 1098-1136 (Electronic)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23633299> >.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, v. 19, n. 8, p. 312-8, Aug 1996. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843599> >.

KRINSKY, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 200, n. 2, p. 248-54, Jun 1992. ISSN 0037-9727 (Print)

0037-9727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579590> >.

LAXTON, A. W.; LOZANO, A. M. Deep brain stimulation for the treatment of Alzheimer disease and dementias. *World Neurosurg*, v. 80, n. 3-4, p. S28 e1-8, Sep-Oct 2013. ISSN 1878-8769 (Electronic)

1878-8750 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722036> >.

LEE, S. et al. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol*, v. 177, n. 5, p. 2549-62, Nov 2010. ISSN 1525-2191 (Electronic)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20864679> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)

1046-2023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LOIDL-STÄHLHOFEN, A.; HANNEMANN, K.; SPITELLER, G. Generation of alpha-hydroxyaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, v. 1213, n. 2, p. 140-8, Jul 14 1994. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8025124> >.

LOSSINSKY, A. S.; SHIVERS, R. R. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol*, v. 19, n. 2, p. 535-64, Apr 2004. ISSN 0213-3911 (Print)

0213-3911 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15024715> >.

LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, v. 523, n. 7560, p. 337-41, Jul 16 2015. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26030524> >.

LYCKE, J. N. et al. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 64, n. 3, p. 402-4, Mar 1998. ISSN 0022-3050 (Print)

0022-3050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527161> >.

LYNCH, M. A. Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function. *Front Aging Neurosci*, v. 1, p. 6, 2010. ISSN 1663-4365 (Electronic)

1663-4365 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552057> >.

MAGISTRETTI, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp Physiol*, v. 96, n. 4, p. 407-10, Apr 2011. ISSN 1469-445X (Electronic)

0958-0670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123364> >.

MARKOWITSCH, H. J.; PRITZEL, M. The neuropathology of amnesia. *Prog Neurobiol*, v. 25, n. 3, p. 189-287, 1985. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4089179> >.

MASSAAD, C. A.; KLANN, E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*, v. 14, n. 10, p. 2013-54, May 15 2011. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20649473> >.

MATTSON, M. P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med*, v. 3, n. 2, p. 65-94, 2003. ISSN 1535-1084 (Print)

1535-1084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728191> >.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*, v. 7, n. 4, p. 278-94, Apr 2006. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552414> >.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, v. 153, n. 3742, p. 1351-8, Sep 16 1966. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5917768> >.

_____. Memory--a century of consolidation. *Science*, v. 287, n. 5451, p. 248-51, Jan 14 2000. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634773> >.

MCNICOLL, L. et al. Delirium in the intensive care unit: occurrence and clinical course in older patients. *J Am Geriatr Soc*, v. 51, n. 5, p. 591-8, May 2003. ISSN 0002-8614 (Print)

0002-8614 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752832> >.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C., JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, v. 173, p. 89-97, Feb 2000. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719670> >.

MICHAUD, M. et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc*, v. 14, n. 12, p. 877-82, Dec 2013. ISSN 1538-9375 (Electronic)

1525-8610 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792036> >.

MILLER, R. H.; RAFF, M. C. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci*, v. 4, n. 2, p. 585-92, Feb 1984. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6366155> >.

MING, Z.; SAWICKI, G.; BEKAR, L. K. Acute systemic LPS-mediated inflammation induces lasting changes in mouse cortical neuromodulation and behavior. *Neurosci Lett*, v. 590, p. 96-100, Mar 17 2015. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25650524> >.

MIYAZAKI, T. et al. Reactive gliosis in areas around third ventricle in association with epileptogenesis in amygdaloid-kindled rat. *Epilepsy Res*, v. 56, n. 1, p. 5-15, Sep 2003. ISSN 0920-1211 (Print)

0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14529949> >.

MORAES, C. A. et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1beta: Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. *Mol Neurobiol*, v. 52, n. 1, p. 653-63, Aug 2015. ISSN 1559-1182 (Electronic)

0893-7648 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257696> >.

MORANDI, A. et al. Statins and brain dysfunction: a hypothesis to reduce the burden of cognitive impairment in patients who are critically ill. *Chest*, v. 140, n. 3, p. 580-5, Sep 2011. ISSN 1931-3543 (Electronic)

0012-3692 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896517> >.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029990> >.

MRAVEC, B. The role of the vagus nerve in stroke. *Auton Neurosci*, v. 158, n. 1-2, p. 8-12, Dec 8 2010. ISSN 1872-7484 (Electronic)

1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869332> >.

NADEL, L. et al. Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus*, v. 10, n. 4, p. 352-68, 2000. ISSN 1050-9631 (Print)

1050-9631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10985275> >.

NEHER, J. J. et al. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, n. 43, p. E4098-107, Oct 22 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101459> >.

NEUMANN, J. et al. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci*, v. 28, n. 23, p. 5965-75, Jun 4 2008. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524901> >.

NOMELLINI, V. et al. An age-associated increase in pulmonary inflammation after burn injury is abrogated by CXCR2 inhibition. *J Leukoc Biol*, v. 83, n. 6, p. 1493-501, Jun 2008. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319289> >.

NONES, J. et al. Flavonoids and astrocytes crosstalking: implications for brain development and pathology. *Neurochem Res*, v. 35, n. 7, p. 955-66, Jul 2010. ISSN 1573-6903 (Electronic)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213345> >.

NORDEN, D. M.; GODBOUT, J. P. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 39, n. 1, p. 19-34, Feb 2013. ISSN 1365-2990 (Electronic)

0305-1846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23039106> >.

OBERHEIM, N. A.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol*, v. 814, p. 23-45, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic)

1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22144298> >.

OKTYABRSKY, O. N.; SMIRNOVA, G. V. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)*, v. 72, n. 2, p. 132-45, Feb 2007. ISSN 0006-2979 (Print)

0006-2979 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367290> >.

PAOLICELLI, R. C. et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, v. 333, n. 6048, p. 1456-8, Sep 9 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778362> >.

PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun*, v. 18, n. 5, p. 407-13, Sep 2004. ISSN 0889-1591 (Print)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265532> >.

PERRY, V. H.; CUNNINGHAM, C.; HOLMES, C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol*, v. 7, n. 2, p. 161-7, Feb 2007. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220915> >.

PERRY, V. H.; NEWMAN, T. A.; CUNNINGHAM, C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n. 2, p. 103-12, Feb 2003. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563281> >.

PFEIFFER, S. E.; WARRINGTON, A. E.; BANSAL, R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol*, v. 3, n. 6, p. 191-7, Jun 1993. ISSN 0962-8924 (Print)

0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14731493> >.

POULSEN, H. E. Oxidative DNA modifications. *Exp Toxicol Pathol*, v. 57 Suppl 1, p. 161-9, Jul 2005. ISSN 0940-2993 (Print)

0940-2993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16092724> >.

QIN, L. et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem*, v. 279, n. 2, p. 1415-21, Jan 9 2004. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14578353> >.

RAMOS, C. L. et al. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J Biol Chem*, v. 267, n. 12, p. 8307-12, Apr 25 1992. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1314821> >.

REIS, P. A. et al. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 6, p. e1000963, 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585569> >.

REIS, P. A. et al. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog*, v. 8, n. 12, p. e1003099, Dec 2012. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300448> >.

ROSENBAUM, J. T. et al. Cytokines. An overview. *Adv Exp Med Biol*, v. 438, p. 441-6, 1998. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634919> >.

RUIPEREZ, V.; DARIOS, F.; DAVLETOV, B. Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog Lipid Res*, v. 49, n. 4, p. 420-8, Oct 2010. ISSN 1873-2194 (Electronic)

0163-7827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580911> >.

SAFAIYAN, S. et al. Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat Neurosci*, v. 19, n. 8, p. 995-8, Aug 2016. ISSN 1546-1726 (Electronic)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294511> >.

SAIJO, K.; GLASS, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, v. 11, n. 11, p. 775-87, Nov 2011. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025055> >.

SALTHOUSE, T. A. Selective review of cognitive aging. *J Int Neuropsychol Soc*, v. 16, n. 5, p. 754-60, Sep 2010. ISSN 1469-7661 (Electronic)

1355-6177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673381> >.

SASTRE, J.; PALLARDO, F. V.; VINA, J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, v. 49, n. 5, p. 427-35, May 2000. ISSN 1521-6543 (Print)

1521-6543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10902575> >.

SCAHILL, R. I. et al. A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol*, v. 60, n. 7, p. 989-94, Jul 2003. ISSN 0003-9942 (Print)

0003-9942 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873856> >.

SCHUTZ, R. A.; IZQUIERDO, I. Effect of brain lesions on rat shuttle behavior in four different tests. *Physiol Behav*, v. 23, n. 1, p. 97-105, Jul 1979. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/515220> >.

SEEHAFER, S. S.; PEARCE, D. A. You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material. *Neurobiol Aging*, v. 27, n. 4, p. 576-88, Apr 2006. ISSN 0197-4580 (Print)

0197-4580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455164> >.

SEGLIN, P. O.; BOHLEY, P. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*, v. 48, n. 2, p. 158-72, Feb 15 1992. ISSN 0014-4754 (Print)

0014-4754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1740188> >.

SESTI, F. Oxidation of K(+) Channels in Aging and Neurodegeneration. *Aging Dis*, v. 7, n. 2, p. 130-5, Mar 2016. ISSN 2152-5250 (Electronic)

2152-5250 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114846> >.

SHAW, A. C.; GOLDSTEIN, D. R.; MONTGOMERY, R. R. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 12, p. 875-87, Dec 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1741 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157572> >.

SIERRA, A. et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, v. 7, n. 4, p. 483-95, Oct 8 2010. ISSN 1875-9777 (Electronic)

1875-9777 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887954> >.

SOHAL, R. S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med*, v. 33, n. 1, p. 37-44, Jul 1 2002. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086680> >.

SQUIRE, L. R. et al. Memory consolidation. Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 7, n. 8, p. a021766, Aug 2015. ISSN 1943-0264 (Electronic)

1943-0264 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26238360> >.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci, v. 899, p. 191-208, 2000. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863540> >.

STIPURSKY, J. et al. Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. Neurochem Res, v. 37, n. 11, p. 2402-18, Nov 2012. ISSN 1573-6903 (Electronic)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22614925> >.

STREIT, W. J. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. J Neurosci Res, v. 77, n. 1, p. 1-8, Jul 1 2004. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15197750> >.

_____. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? Trends Neurosci, v. 29, n. 9, p. 506-10, Sep 2006. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859761> >.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. Prog Neurobiol, v. 57, n. 6, p. 563-81, Apr 1999. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221782> >.

SZWEDA, P. A. et al. Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems. Ageing Res Rev, v. 2, n. 4, p. 383-405, Oct 2003. ISSN 1568-1637 (Print)

1568-1637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522242> >.

TAYLOR, R. C.; DILLIN, A. Aging as an event of proteostasis collapse. Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 3, n. 5, May 2011. ISSN 1943-0264 (Electronic)

1943-0264 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441594> >.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. Nature, v. 420, n. 6917, p. 853-9, Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490958> >.

TREMBLAY, M. E.; LOWERY, R. L.; MAJEWSKA, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*, v. 8, n. 11, p. e1000527, 2010. ISSN 1545-7885 (Electronic)

1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072242> >.

VERAS, R. Population aging today: demands, challenges and innovations. *Rev Saude Publica*, v. 43, n. 3, p. 548-54, Jun 2009. ISSN 1518-8787 (Electronic)

0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19377752> >.

VERWEIJ, B. H.; AMELINK, G. J.; MUIZELAAR, J. P. Current concepts of cerebral oxygen transport and energy metabolism after severe traumatic brain injury. *Prog Brain Res*, v. 161, p. 111-24, 2007. ISSN 0079-6123 (Print)

0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618973> >.

VIVIANI, B. et al. Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicol Lett*, v. 149, n. 1-3, p. 85-9, Apr 1 2004. ISSN 0378-4274 (Print)

0378-4274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093252> >.

VIVIANI, B.; GARDONI, F.; MARINOVICH, M. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *Int Rev Neurobiol*, v. 82, p. 247-63, 2007. ISSN 0074-7742 (Print)

0074-7742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17678965> >.

WAKE, H. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, v. 29, n. 13, p. 3974-80, Apr 1 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339593> >.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol*, v. 7, n. 1, p. 47-53, Feb 2011. ISSN 1741-0533 (Electronic)

1740-925X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22613055> >.

WALLENSTEIN, G. V.; VAGO, D. R.; WALBERER, A. M. Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. *Behav Brain Res*, v. 133, n. 2, p. 159-64, Jul 18 2002. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110449> >.

XIE, Z. et al. Aging and glial responses to lipopolysaccharide in vitro: greater induction of IL-1 and IL-6, but smaller induction of neurotoxicity. *Exp Neurol*, v. 182, n. 1, p. 135-41, Jul 2003. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821383> >.

YE, S. M.; JOHNSON, R. W. An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation*, v. 9, n. 4, p. 183-92, 2001. ISSN 1021-7401 (Print)

1021-7401 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847480> >.

ZHANG, Q. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, v. 464, n. 7285, p. 104-7, Mar 4 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203610> >.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2013, p. 316523, 2013. ISSN 1942-0994 (Electronic)

1942-0994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23983897> >.

ZHU, X. et al. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*, v. 9, n. 2, p. 147-53, Jul 2006. ISSN 1387-2877 (Print)

1387-2877 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873962> >.

ZHU, Z. et al. Inhibiting cell cycle progression reduces reactive astrogliosis initiated by scratch injury in vitro and by cerebral ischemia in vivo. *Glia*, v. 55, n. 5, p. 546-58, Apr 1 2007. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17243097> >.

ZINDLER, E.; ZIPP, F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 24, n. 4, p. 551-62, Dec 2010. ISSN 1878-1608 (Electronic)

1521-6896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619866> >.