UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA

ALESSANDRA MACEDO PINTO

Avaliação dos comportamentos de ansiedade e memória de camundongos com envelhecimento acelerado, submetidos a tratamento com íons de lítio

São Paulo
2019

ALESSANDRA MACEDO PINTO

Avaliação dos comportamentos de ansiedade e memória de camundongos com envelhecimento acelerado, submetidos a tratamento com íons de lítio

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Gerontologia.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 28 de junho de 2019. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração:

Gerontologia

Orientadora:

Profª. Drª. Tânia Araújo Viel

São Paulo

2019

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

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO
(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)
CRB 8-4936

Pinto, Alessandra Macedo
Avaliação dos comportamentos de ansiedade e memória de camundongos com envelhecimento acelerado, submetidos a tratamento com íons de lítio / Alessandra Macedo Pinto ; orientadora, Tânia Araújo Viel. – 2019
52 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo
Versão corrigida

1. Doença de Alzheimer - Tratamento; Experimentação e experimentos. 2. Camundongos. 3. Memória. 4. Ansiedade. 5. Envelhecimento. 6. Lítio. I. Viel, Tânia Araújo, orient. II. Título

CDD 22.ed. – 618.976831

Nome: PINTO, Alessandra Macedo

Título: Avaliação dos comportamentos de ansiedade e memória de camundongos com envelhecimento acelerado, submetidos a tratamento com íons de lítio.

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Gerontologia.

Área de Concentração:

Gerontologia

Aprovado em: 28/06/2019

Banca Examinadora

Profª. Drª. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas

Profa. Dra. Ruth Caldeira de Melo

Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades

Prof. Dr. Rodrigo Portes Ureshino

Universidade Federal de São Paulo. Departamento de Ciências Biológicas

Dedico este trabalho à toda minha família e em especial à minha tia e madrinha Eunises Xavier Thomaz, que sempre me apoiou e foi quem mais me incentivou a iniciar o mestrado.

Agradecimentos

À CAPES pelo apoio financeiro durante o processo de execução desse trabalho.

À professora Tânia Araújo Viel por acreditar na minha capacidade de realizar esse trabalho, pela orientação e suporte no decorrer do processo.

À professora Ruth Caldeira que me ajudou e aconselhou no início da elaboração do artigo.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa que me apoiaram e ajudaram muito no desenvolvimento das atividades no laboratório e me deram suporte emocional quando tudo parecia que não ia funcionar.

À minha prima Isabella Xavier Thomaz, que conviveu diariamente com meu estresse quando escrever parecia tão difícil e soube entender quando eu reclamava tanto de cansaço mental.

RESUMO

PINTO, Alessandra Macedo. **Avaliação dos comportamentos de ansiedade e memória dos camundongos com envelhecimento acelerado, submetidos a tratamento com íons de lítio**. 2019. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Versão corrigida.

Com o aumento da expectativa de vida, surgem indagações em relação à qualidade desses anos que serão vividos a mais. Durante o processo de envelhecimento, ocorrem alterações naturais que podem resultar em disfunções fisiológicas. Da mesma forma, o cérebro se altera e se adapta ao longo desse processo, podendo ocorrer danos à funcionalidade desse órgão. Entre os agravos mais comuns ao sistema nervoso central está a doença de Alzheimer (DA), que compromete a função cognitiva, aprendizado e memória. A abordagem terapêutica utilizada no tratamento da DA até o momento não é capaz de reverter as perdas funcionais no cérebro, além de causar alguns efeitos colaterais indesejados. Diante disso, uma alternativa ou adjuvante no tratamento da perda de memória na DA faz-se necessário. Nosso grupo de pesquisa demonstrou o efeito do carbonato de lítio em microdose na estabilização da memória em estudos prévios. No entanto, ainda existe muito a ser avaliado a respeito de aspectos moleculares relacionados ao tratamento com esse íon. O presente estudo buscou avaliar os aspectos comportamentais do efeito da microdose desse íon na memória e ansiedade de camundongos com envelhecimento acelerado (SAMP-8). Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem SAMP-8 ("senescence-accelerated mouse prone") que possuem envelhecimento acelerado. Os animais SAMP-8 foram divididos em 2 grupos: um grupo que recebeu somente água filtrada por via oral durante todo o processo de envelhecimento (n = 12) e um grupo que recebeu carbonato de lítio na dose de 0,25 mg/kg por via oral (n = 12). Como controle dos animais SAMP-8, foram utilizados os animais resistentes ao envelhecimento acelerado SAMR-1 (“senescence-accelerated mice-resistant”, n = 10). Foram aplicados testes de comportamento para avaliar a memória espacial e aversiva, bem como o comportamento de ansiedade desses animais. Foi verificado que tratamento com lítio em microdose promoveu a manutenção da memória espacial e aversiva ao longo do envelhecimento. Os testes

de avaliação de ansiedade mostraram um efeito positivo da microdose do lítio na redução do estado ansioso.

Palavras-chave: memória. ansiedade. lítio. modelo animal.

ABSTRACT

PINTO, Alessandra Macedo. **Evaluation of anxiety and memory behaviors of accelerated aging mice submitted to treatment with lithium ions**. 2019. 52 p. Dissertation (Master of Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2019. Corrected version.

Due to an increase in life expectancy, questions arise about the quality of those years people will live longer. During the aging process, natural changes occur that can result in physiological dysfunctions. The brain can change and adapt during this process and that can compromise its effectiveness. Among the most common dysfunction to the central nervous system is Alzheimer's disease (AD), which compromises cognitive function, learning and memory. The current therapeutic approach used in the treatment of AD is not able to reverse functional losses in the brain. Besides, it can cause some unwanted side effects. Therefore, an alternative or adjuvant in the treatment of memory loss in AD is necessary. Our research group demonstrated the effect of microdose lithium carbonate in stabilizing memory in previous studies. However, there is still much to be discover regarding molecular aspects related to treatment with this ion. The present study aimed to evaluate the behavioral aspects of the microdose lithium effect on memory and anxiety in Senescence accelerated mouse prone (SAMP-8). For that purpose, we used female SAMP-8 mice (senescence-accelerated mouse prone). SAMP-8 mice were divided into 2 groups: one group that received only oral filtered water during the whole aging process (n = 12) and one group that received 0.25 mg / kg lithium carbonate (n = 12). SAMR-1 (senescence-accelerated mice-resistant, n = 10) were used as a control. Behavior tests were applied to evaluate the aversive and spatial memory, as well as animals' anxiety behavior. Treatment with microdose lithium promoted the maintenance of the spatial and aversive memory in SAMP-8 MICE along the aging process. Anxiety testing showed a positive effect of microdose lithium on reducing anxiety in SAMP-8.

Keywords: Memory. Anxiety. Lithium. Animal model

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de potenciação de longa duração como modelo biológico para a formaçao das memórias 15
Figura 2 – Labirinto de Barnes 27
Figura 3 – Esquiva inibitória 28
Figura 4 – Labirinto em Cruz Elevado 29
Figura 5 – Tubo de PVC com ração para roedores preparado para o teste de “entocar-se” 30
Figura 6 – Memória espacial de animais SAMP-8 e SAMR-1 fêmeas, medida em labirinto terrestre de Barnes. 32
Figura 7 – Memória espacial de animais SAMP-8 tratados com água e com microdose de lítio, medida em labirinto terrestre de Barnes 33
Figura 8 – Memória aversiva registrada em equipamento de esquiva inibitória 35
Figura 9 – Comportamento estereotipado medido em labirinto terrestre de Barnes 36
Figura 10 – Número de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e número de "head-dippings" registrados em Labirinto em Cruz Elevado ... 37
Figura 11 – Comportamento de “entocar-se” de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 tratados ou não com íons de lítio 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fenótipos patobiológicos da linhagem SAMP-8 ..... 18/19
Tabela 2 – Valores de medianas e intervalos interquartis da latência (s) para os animais entrarem no lado escuro da caixa de esquiva inibitória 34

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 11

1.1 Envelhecimento e Memória 12

1.2 Uso do camundongo SAM como modelo para estudo do envelhecimento e da memória 17

1.3 Influência das emoções na formação e manutenção da memória ao longo do envelhecimento 20

1.4 Uso dos íons de lítio no envelhecimento e na doença de Alzheimer 21

2 **HIPÓTESE** 23

3 **OBJETIVO** 24

4 **MATERIAL E MÉTODOS** 25

4.1 Avaliação comportamental da memória espacial 26

4.2 Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo 27

4.3 Avaliação do comportamento de ansiedade 28

4.4 Análise Estatística 30

5 **RESULTADOS** 31

5.1 Avaliação do tratamento com íons de lítio para a memória espacial 31

5.2 Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo 33

5.3 Avaliação do tratamento com íons de lítio para o comportamento de ansiedade. 35

6 **DISCUSSÃO** 39

7 **CONCLUSÃO** 44

REFERÊNCIAS 45

1 INTRODUÇÃO

A população brasileira, bem como a mundial, vem passando por uma série de transformações determinadas por mudanças expressivas na evolução demográfica. As condições e situações dos fenômenos da vida – fecundidade e mortalidade – vivenciadas em toda a extensão do país vêm apresentando modificações de maneira rápida nas últimas décadas, resultando em desafios e oportunidades para nossa sociedade.

Um cenário de envelhecimento populacional vem se despontando como consequência dessas alterações. A parcela que mais ascende na população brasileira é a de idosos, com níveis de crescimento de mais de 4% ao ano no período de 2012 a 2022. A população com 60 anos ou mais de idade passa de 14,2 milhões, em 2000, para 19,6 milhões, em 2010, podendo atingir 41,5 milhões, em 2030, e 73,5 milhões, em 2060 (IBGE, 2015).

Com o aumento da expectativa de vida, surgem indagações em relação a qualidade desses anos vividos a mais. As questões mais relevantes estão relacionadas à dúvida se o acréscimo de anos seria acompanhado ou não de boa saúde e livre de incapacidades (CHAIMOWICKS; CAMARGOS, 2013). Durante o processo de envelhecimento, ocorrem alterações naturais que podem resultar em disfunções fisiológicas (PASCHOAL, 2013; FREITAS, 2013).

Diante desse cenário, a biogerontologia, uma área biomédica que estuda o processo de envelhecimento em seus aspectos biológicos, tem como propósito não somente pesquisar os fatores relacionados à expectativa de vida, mas examinar condições que poderiam promover uma vida saudável, com qualidade, preservando a mobilidade, a capacidade mental, a produtividade e o bem-estar durante o processo de envelhecimento (HEIDERSTADT; KENNETT, 2011).

O envelhecimento biológico é um processo complexo e heterogêneo que resulta em um acúmulo de alterações que podem comprometer a capacidade funcional de órgãos e tecidos. Esse processo é inevitável, progressivo e multifatorial, que ainda não foi completamente elucidado. A maneira como se desenvolve e sua dinâmica continuam desconhecidos.

O somatório de alterações orgânicas, funcionais e psicológicas que são próprios do envelhecimento normal é chamada de **senescência**. Alguma perda acontece em uma função específica no decorrer do envelhecimento, no entanto os

indivíduos conseguem manter um padrão fisiológico satisfatório com o avançar da idade. Por outro lado, quando essas alterações são acompanhadas por enfermidades que acometem as pessoas idosas, denomina-se **senilidade**. No envelhecimento patológico, as perdas acontecem em uma intensidade muito maior, causando deficiências funcionais e modificações importantes nas funções do SNC, impactando na capacidade intelectual do indivíduo, como modificações no raciocínio, atenção, memória, prejuízos na fala e comunicação, causando prejuízo nas relações, afetividade, atitude e personalidade (NETTO, 2013).

O conceito de envelhecimento saudável, ainda controverso na área da gerontologia, tem sido remetido a várias definições de como envelhecer bem. Rowe e Kahn definem envelhecimento bem-sucedido incluindo três principais componentes: baixo risco de doença e de incapacidades relacionadas à doença, completa capacidade física e cognitiva e envolvimento ativo com a vida (ROWE, J.W., KAHN, 1997).

1.1 Envelhecimento e Memória

Assim como outros órgãos, o encéfalo também se altera e se adapta ao longo do processo de envelhecimento. O Sistema Nervoso Central (SNC) é incumbido de diversas funções (sensações, movimentos, funções psíquicas, etc.) e responsável pelas funções vegetativas (funções biológicas internas). Podem ocorrer anomalias nas células nervosas, nos neurônios, nas células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) durante o processo de envelhecimento, decorrentes de causas intrínsecas (genéticas, metabólicas, circulatórias, excesso da produção de radicais livres) e extrínsecas (inatividade física, alterações ambientais, tabagismo, radiações, etc.), que tendem a causar danos com o passar dos anos (CANÇADO et al., 2013; FREITAS, 2013). Uma das consequências desses danos às células nervosas parece estar relacionada ao aumento do desenvolvimento de demências. Entre as demências destaca-se a Doença de Alzheimer (DA), que provoca perda irreversível da memória e capacidade cognitiva gerando alto grau de incapacidade. A DA é uma doença neurodegenerativa com caráter progressivo, cuja etiologia ainda não foi totalmente esclarecida.

O comprometimento da memória é, em geral, o sintoma mais relevante e precoce da DA, principalmente de memória declarativa episódica. Os lapsos de

memória de evocação nas fases iniciais dizem respeito, principalmente, à dificuldade para recordar datas, compromissos, nomes familiares e fatos recentes (MACHADO, 2013).

Conceitua-se memória como sendo a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações (LEZAK; HOWIESON; BIGLER, 2012). Esse processo demanda modificações morfológicas em sinapses que compreendem aumento no fortalecimento e número de novas conexões neuronais, o que é conhecido como neuroplasticidade. O processo biológico que leva às alterações sinápticas e que é o mais reconhecido como modelo para a formação das memórias é denominado potenciação de longa duração (do inglês – “long term potentiation” - LTP). A LTP, que ocorre no hipocampo e em outras regiões do cérebro, é decorrente de transformações sinápticas que são mantidas por um longo período de tempo posterior à transcrição gênica, resultando em um aumento na eficácia da transmissão sináptica (KANDEL, 2001; PANG; LU, 2004; IZQUIERDO et al., 2008). Várias teorias foram apresentadas corroborando a proposta de que a LTP é o modelo biológico mais aceito para representar a formação e consolidação da memória. A hipótese dessa relação permanece consistente até os dias atuais (IZQUIERDO et al., 2008).

A memória pode ser classificada em memória declarativa e memória não declarativa. A memória declarativa (também chamada de memória explícita) é fundamentada na rápida aprendizagem de fatos e eventos específicos que são acessíveis à consciência. Os dois componentes principais da memória declarativa são a memória semântica (memória de linguagem ou códigos) e memória episódica (memória de fatos e episódios) (SQUIRE; WIXTED, 2011; TULVING, 1985).

Memória não declarativa inclui habilidades, hábitos e formas simples de condicionamento. É expressa através de desempenho ao invés de lembrança, além de ser acessada de uma forma inconsciente (TULVING, 1985).

O hipocampo é a estrutura do encéfalo que é fundamental para a formação da memória declarativa (SQUIRE; DEDE, 2015). O fato de que existem vários tipos de memória é amplamente aceito atualmente e a implicação desse fato é que os alvos terapêuticos para os diferentes tipos de memória podem ser bastante distintos (SQUIRE; DEDE, 2015).

Em indivíduos idosos, a perda da memória está tanto relacionada às perdas estruturais (densidade de neurônios e sinapses) quanto à funcionalidade da LTP,

devido a interferências na indução, expressão ou consolidação do processo e também como resultado de um declínio dos moduladores positivos (neurotransmissores como acetilcolina e noradrenalina) ou aumento dos moduladores negativos da memória (como a adenosina). Porém, ainda não se estabeleceu um mecanismo definido para essas alterações neurofarmacológicas (IZQUIERDO et al., 2008).

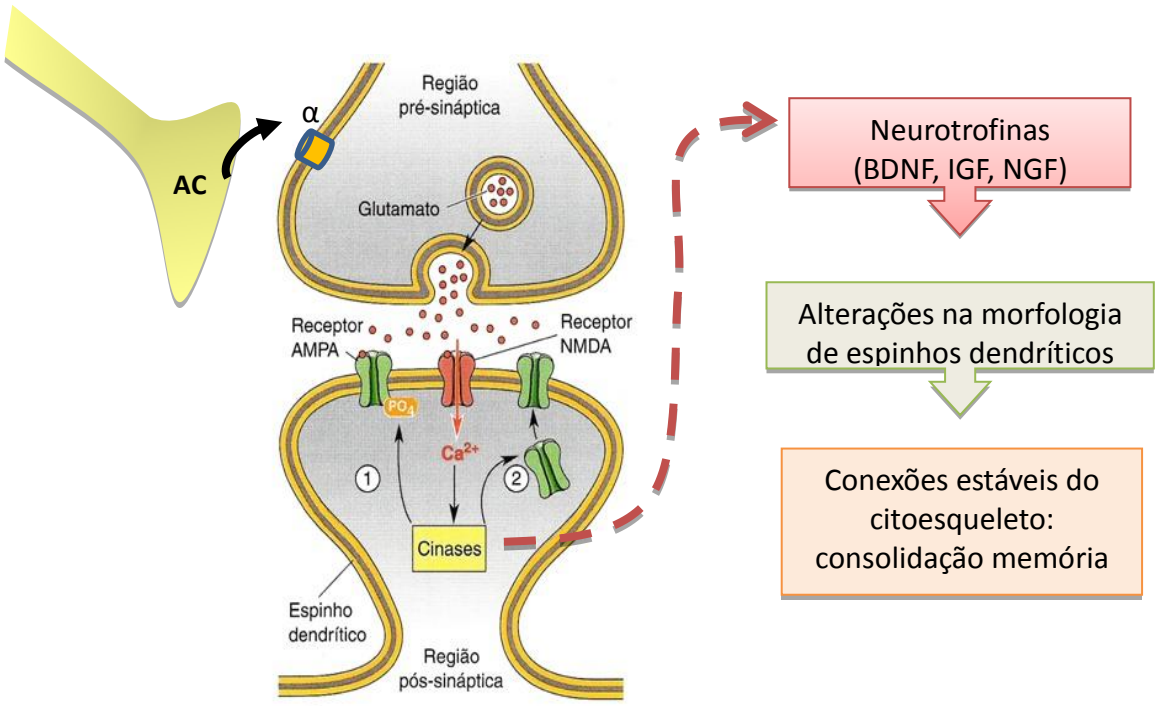
O hipocampo é a principal área cerebral onde ocorrem importantes funções relacionadas à formação da memória e aprendizagem (BARKUS et al., 2010). Nessa área acontecem as alterações nas transmissões neuronais relacionadas à plasticidade sináptica. O neurotransmissor glutamato e seus receptores estão particularmente envolvidos no processo de formação da memória. Os receptores do glutamato estão presentes nas membranas dos neurônios e células gliais e são classificados em dois diferentes grupos: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos do glutamato são canais iônicos e incluem o 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxaole-4-propinate (AMPA) e N-methyl-D-aspartate (NMDA). O estímulo desses receptores abre seus canais permitindo a entrada de Ca^{2+} e levando à produção de neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês “brain-derived neurotrophic fator”, BDNF), fator de crescimento semelhante à insulina (do inglês “insuline-like growth fator”, IGF) e fator de crescimento neuronal (do inglês “nerve growth fator”, NGF) (Figura 1). A expressão e ação dessas neurotrofinas induzem e mantêm a LTP e, consequentemente, a neuroplasticidade (BAUDRY; XIAONING; GALL, 2012).

Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) são acoplados à proteína G e possuem 7 domínios transmembranares. Eles são subdivididos em três grupos: grupo 1 (mGlur 1 e mGluR5); grupo 2 (mGluR 2 e mGluR3) e grupo 3 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8. Os receptores mGluR 1 e mGluR5 (grupo 1) são acoplados à proteína G_q e os demais receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G_i (BHATTACHARYYA, 2016; FERRAGUTI; CREPALDI; NICOLETTI, 2008; NICOLETTI et al., 2011). Diferentemente dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, que são excitatórios, os mGluRs causam respostas sinápticas mais lentas que podem aumentar ou diminuir a excitabilidade das células pós-sinápticas. (CITRI; MALENKA, 2008; LEE, 2006). Os receptores metrabotrópicos estão envolvidos em respostas fisiológicas e patológicas ao neurotransmissor glutamato

em regiões do hipocampo, entre essas respostas estão incluídas transmissão sináptica e excitabilidade neuronal (ANWYL, 1999; MANNAIONI et al., 2001).

O grupo 1, portanto o mGluR1 e mGluR5, são apontados como tendo importância fundamental para a atividade sináptica hipocampal (MANAHAN-VAUGHAN, 1997; MANNAIONI et al., 2001; NEYMAN; MANAHAN-VAUGHAN, 2008). A ativação do mGluR1 resulta no aumento da concentração intracelular de cálcio, despolarização de neurônios na região do CA1 no hipocampo e aumento da frequência de potenciais pós-sinápticos inibitórios (MANNAIONI et al., 2001). Por outro lado, o estímulo e ativação do mGluR5 resulta na supressão da corrente de potássio ativada por cálcio e uma potencialização das correntes do receptor NMDA (MANNAIONI et al., 2001; MANZONI; WEISSKOPF; NICOLL, 1994). As diferentes contribuições funcionais dos subtipos mGluR do grupo 1 à excitabilidade celular podem ter consequências distintas para a plasticidade sináptica e os processos de memória (NEYMAN; MANAHAN-VAUGHAN, 2008).

Figura 1 - Mecanismo de potenciação de longa duração como modelo biológico para a formação das memórias. O receptor nicotínico α7, após ativação pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh) modula a liberação de Glutamato, evitando o excesso desse neurotransmissor, o que causaria excitotoxicidade. Essa modulação pelo receptor α7 contribui para a formação e manutenção da LTP e, consequentemente, da memória. Fonte: Abrão et al, em fase final de redação.



Fonte: Viel, TA. Bases moleculares da neuroproteção determinada por estratégias para a promoção do envelhecimento saudável. 2016 (105 f.) Tese (Livre-Docência) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Existem outras formas de plasticidade sináptica de longa duração além da LTP. Uma das variações de plasticidade sináptica é LTD (do inglês “Long Term Depression”). Os mGluRs desempenham função importante nas diferentes formas de plasticidade sináptica, tanto na LTP quanto na LTD, que são aceitas como a origem do aprendizado e memória (NEYMAN; MANAHAN-VAUGHAN, 2008; PIN; DUVOISIN, 1995). Já foi descrito que durante o envelhecimento ocorre um comprometimento nas funções de indução e manutenção da LTP (KUMAR; FOSTER, 2013).

Vários sistemas de neurotransmissores modulam a formação do LTP, entre eles o sistema colinérgico (FUJII et al., 1999; MATSUYAMA; MATSUMOTO, 2003). Consequentemente, esse sistema tem sido relacionado aos processos de aprendizagem e consolidação da memória (MARTÍ BARROS et al., 2004; NOTT; LEVIN, 2006; NIEWIADOMSKA; BAKSALERSKA-PAZERA, 2009). Em particular, há evidências da participação do receptor colinérgico nicotínico α7 (nAChR α7) na atividade hipocampal (MIELKE; MEALING, 2009), re-consolidação da memória (BOCCIA et al., 2010) e atenção sustentada (HOYLE et al., 2006; YOUNG et al., 2007; REZVANI et al., 2009; VIEL et al., 2012). Além disso, é descrito o papel anti-inflamatório e neuroprotetor desse receptor em doenças neurodegenerativas e situações estressantes (SHYTLE et al., 2004; CONEJERO-GOLDBERG; DAVIES; ULLOA, 2008; HUNTER et al., 2010).

A redução da funcionalidade do sistema colinérgico é uma das hipóteses de base farmacológica da doença de Alzheimer, o que fundamenta o tratamento das fases leves e intermediárias com inibidores da colinesterase (rivastigmina, galantamina, donepezila) (WAITE, 2015), enzima que degrada o neurotransmissor acetilcolina proporcionando, assim, um aumento da função do sistema colinérgico e aumento da indução e manutenção da LTP.

O receptor de glutamato NMDA é um importante mediador da neuroplasticidade e também exerce um papel fundamental no controle da emoção e cognição. Os antagonistas do receptor NMDA impedem a indução de certas formas de LTP. Esses antagonistas afetam vários aspectos emocionais incluindo medo,

ansiedade e depressão, além de prejudicar certas formas de aprendizagem e memória (BARKUS et al., 2010).

1.2 Uso do camundongo SAM como modelo para estudo do envelhecimento e da memória

A linhagem SAM ("Senescence-accelerated mouse") é proveniente de mutação espontânea do cruzamento consanguíneo de camundongos AKR/J, realizada pelo Dr. Takeda na Universidade de Kyoto (TAKEDA; HOSOKAWA; HIGUCHI, 1991). Com a finalidade de manter a cepa, houve a continuação do cruzamento entre esses animais irmãos sob condições normais. No entanto, foi observado que algumas ninhadas desses animais apresentavam um certo grau de diminuição da atividade motora, alopecia, perda do brilho dos pelos, espessamento da pele, lesões perioftálmicas, lordocifose e morte precoce (TAKEDA, 1999). Esses camundongos apresentavam desenvolvimento e maturação normais, porém, manifestavam início precoce no avanço do processo de envelhecimento. O padrão de envelhecimento neste modelo, portanto, parece estar relacionado a um aumento da velocidade do processo e não a um envelhecimento prematuro (TAKEDA; HOSOKAWA; HIGUCHI, 1991).

Outros camundongos da mesma ninhada apresentavam desenvolvimento e envelhecimento normais. Uma escala de pontuação foi usada para avaliar o grau de envelhecimento dos camundongos, utilizando um protocolo próprio. Cada categoria listada no protocolo foi baseada nos sinais clínicos e lesões macroscópicas apresentadas e que são relacionadas ao processo de envelhecimento.

Os animais que apresentavam alterações precoces relacionadas à idade foram selecionados como progenitores de camundongos da série P ("senescence – prone"). As ninhadas que apresentavam desenvolvimento e envelhecimento normais foram selecionados para gerarem a série R ("senescence-resistant") (TAKEDA et al., 1981). A média de sobrevida do SAMP é de 9,7 meses, enquanto a do SAMR é de 16,3 meses (TAKEDA; HOSOKAWA; HIGUCHI, 1997).

Existem 12 linhagens SAM, todas originadas das séries P e R. As cepas consanguíneas propensas ao envelhecimento acelerado (SAMP) incluem SAMP1, SAMP2, SAMP3, SAMP6, SAMP7, SAMP8, SAMP9, SAMP10 e SAMP11; e as linhagens endogâmicas resistentes ao envelhecimento acelerado (SAMR) são

SAMR1, SAMR4 e SAMR5. Durante o percurso do desenvolvimento da linhagem SAM, tornou-se incontestável que a cepa SAMP apresenta vários fenótipos patobiológicos característicos que as diferenciam entre si, além do envelhecimento precoce (TAKEDA; HOSOKAWA; HIGUCHI, 1997). Entre esses fenótipos estão incluídos fenótipos neurobiológicos, tais como déficits de aprendizado e memória, distúrbios emocionais, alteração dos ritmos circadianos, resposta imune prejudicada, deficiência auditiva, etc, (Tabela 1) (TAKEDA, 1999). Dados encontrados em autopsias das séries P e R, indicaram que houve um desvio genético de SAM a partir da linhagem original AKR/J (AKIGUCHI et al., 2017; TAKEDA; HOSOKAWA; HIGUCHI, 1997; MAYFORD; SIEGELBAUM; KANDEL, 2012). Um dos achados patológicos mais relevantes nesta cepa, foi a baixa incidência de linfoma tímico em ambas as séries, R (16.3%) e P (8,3%) (TAKEDA et al., 1981).

Tabela 1- Fenótipos patobiológicos da linhagem SAMP-8

Linhagem	Fenótipos
SAMP	
SAMP-1	Amiloidose senil, rim contraído, resposta imune prejudicada, superinsuflação dos pulmões, audição prejudicada, doença vascular hipertensiva
SAMP-1/ Ka	Amiloidose senil
SAMP-1 TA	Aprendizagem e memória prejudicadas
SAMP-2	Amiloidose senil e secundária, rins contraídos, resposta imune prejudicada, catarata, perda óssea alveolar
SAMP-3	Doença degenerativa da articulação mandibular
SAMP-6	Osteoporose senil, amiloidose secundária
SAMP-6/Ta	Osteoporose senil
SAMP-7	Linfoma tímico linfoblástico, amiloidose senil
SAMP-8	Déficit no aprendizado e memória, resposta imune prejudicada, alteração no ritmo circadiano
SAMP-8/Ta	Déficit no aprendizado e memória, disfunção emocional (diminuição da ansiedade), alteração do ritmo circadiano, sistema imune prejudicado

continua

continuação

Linhagem	Fenótipos
SAMP-9	Catarata, linfoma linfoblástico do timo, amiloidose senil
SAMP-10	Atrofia cerebral, déficit no aprendizado e memória
SAMP-10/Ta	Déficit no aprendizado e memória, disfunção emocional (comportamento depressivo), ritmo circadiano alterado
SAMP-11	Rim contraído, amiloidose senil
SAMR	
SAMR-1	Não apresenta linfoma tímico, sarcoma histiocítico, cistos ovarianos
SAMR-1/Ta	
SAMR-4	Não apresenta linfoma do timo, sarcoma histiocítico
SAMR-5	Colite

conclusão

Fonte: (TAKEDA, 1999)

Entre as linhagens SAMP, o SAMP-8 apresenta uma característica distinta das outras cepas, que é o início precoce de comprometimento do aprendizado e memória relacionados à idade em comparação ao seu controle SAMR-1 (TAKEDA; HOSOKAWA; HIGUCHI, 1991; FLOOD; MORLEY, 1992).

A deficiência no aprendizado e memória no modelo animal SAMP-8 se manifesta através de testes de comportamentos já estabelecidos (YANAI; ENDO, 2016).

Existe um considerável número de testes de comportamento para avaliar a memória espacial em animais, no entanto os mais utilizados são o Labirinto Aquático de Morris - LAM, o Labirinto de Barnes – LB e o Labirinto radial.

Utilizando testes de reconhecimento de objeto, foi demonstrado que o aprendizado e memória do SAMP-8 começa a mostrar uma tendência de deterioração a partir de 4 meses de idade (YANAI; ENDO, 2016), embora alguns estudos relatam alterações da memória a partir de 8 meses de idade (MIYAMOTO et al., 1986; FLOOD; MORLEY, 1992; IKEGAMI, SHUMIYA, & KAWAMURA; A.L., E.L., & D.K., 1998). A incapacidade de SAMP-8 em reconhecer as mudanças na posição espacial do objeto indica distúrbio de processamento de informações no hipocampo (BARKER; WARBURTON, 2015).

Embora nenhum modelo animal consiga imitar fidedignamente as alterações fisiológicas ocorridas durante o processo de envelhecimento do ser humano, a linhagem SAMP-8 é considerada um interessante modelo animal para estudar o processo de aprendizagem e memória, visto que essas alterações nesse modelo animal estão associadas à idade (PALLAS et al., 2008).

Além de apresentar disfunção na aprendizagem e memória com o avançar da idade, a linhagem SAMP-8 apresenta uma alteração do estado emocional caracterizado por um comportamento semelhante à ansiedade (TAKEDA; HOSOKAWA; HIGUCHI, 1997; CHEN et al., 2007)

Além de ser um bom modelo para pesquisa sobre aprendizagem e memória no envelhecimento, a linhagem SAMP-8 é essencial para compreender o mecanismo fisiopatológico da Doença de Alzheimer (DA) (CHEN et al., 2007; CHENG; ZHOU; ZHANG, 2014; TAKEDA, 1999; PALLAS et al., 2008; FLOOD; MORLEY, 1992; DEL VALLE et al., 2012), pois apresenta aumento da expressão de proteína precursora de β amilóide (APP) (DEL VALLE et al., 2012); aumento de estresse oxidativo (MORLEY et al., 2012) e fosforilação da proteína Tau (CANUDAS et al., 2005) em hipocampo no decorrer do percurso de vida.

Em estudos para entender a DA normalmente são utilizados animais transgênicos que apresentam a expressão de características patológicas da doença associada a mutações específicas presentes na DA de início precoce. No entanto, a linhagem SAMP-8 tem sido bem aceita, atualmente, como sendo um modelo animal mais fidedigno para estudar o comportamento e histopatologia da DA esporádica (DEL VALLE et al., 2010; PALLAS et al., 2008), pois exibe características como atrofia cortical, perda de células neuronais, gliose, estresse oxidativo, aumento dos níveis de peptídeo β amilóide (Aβ) no cérebro, alterações da fosforilação da proteína tau e déficits no aprendizado e memória (MORLEY et al., 2012).

1.3 Influência das emoções na formação e manutenção da memória ao longo do envelhecimento

Estruturas cerebrais no lobo temporal medial, como o hipocampo e amígdala situam-se na interface entre emoção e cognição e são as prováveis regiões onde os antagonistas de receptores NMDA podem exercer seus efeitos sobre a emoção (BARKUS et al., 2010).

Em termos neuropsicológicos, o papel do hipocampo no que se refere à emoção, enfatiza sua importância para a ansiedade. Nesses mesmos termos, a ansiedade é descrita como a resposta emocional que surge em situações de conflito e incerteza. É uma resposta a um perigo potencial que se desenvolve para evitar que um organismo entre em situações potencialmente perigosas. A ansiedade é considerada distinta do medo, pois é uma resposta ao perigo iminente, e diversos circuitos neurais estão envolvidos nesses diferentes comportamentos defensivos e protetores (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Existem estudos que evidenciam a importante relação do hipocampo na ansiedade. Lesões no hipocampo e, especificamente, lesões no hipocampo ventral têm um efeito robusto nos testes laboratoriais de ansiedade sem condicionamento, que geram um conflito de aproximação/rejeição. Esses testes são baseados na aproximação versus esquiva de conflitos, que provê a base para a maioria dos testes de ansiedade em laboratório (BARKUS et al., 2010).

1.4 Uso dos íons de lítio no envelhecimento e na doença de Alzheimer

A literatura vem mostrando que a manutenção da função cognitiva, durante a velhice, depende da formação de reservas cognitivas e estruturais (VALENZUELA, 2008; PETROSINI et al., 2009; BARALDI et al., 2013), o que serviria para a construção de uma resiliência cognitiva, que pode ser entendida como uma forma de resistência a possíveis futuros danos. Essas reservas são construídas a partir da alimentação saudável e de estimulações durante práticas de atividade física, social, motora, sensorial e cognitiva e podem ser o ponto-chave que separa a manutenção da memória durante o envelhecimento saudável e os estados iniciais de demência.

Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa vem estudando estratégias para reduzir a evolução da doença de Alzheimer e diminuir suas características neuropatológicas. Entre essas estratégias está o uso do carbonato de lítio em microdoses. Demonstramos a estabilização da memória de humanos com o tratamento crônico com esse metal (NUNES; VIEL; BUCK, 2013) e a melhora da memória espacial e relacionada a estímulo aversivo em camundongos transgênicos para a DA (NUNES et al., 2015). Além disso, houve redução da ansiedade e da densidade de placas senis, manutenção da densidade neuronal e aumento da neurotrofina BDNF nesse mesmo modelo animal. A redução da ansiedade também

foi observada nos camundongos controles, de mesma idade e que não apresentaram neurodegeneração (NUNES et al., 2015a).

É conhecido que níveis moderados de déficit cognitivo e alterações cerebrais sutis precedem, em muitos anos, o aparecimento das demências. Esse estado, denominado "comprometimento cognitivo leve" (CCL) é caracterizado por um déficit objetivo em um domínio cognitivo (memória) ou em vários domínios e pode progredir para um transtorno neurocognitivo, caracterizado como demência (DSM-5, 2014). Acredita-se, ainda, que o CCL seja uma versão prodrômica da doença de Alzheimer, podendo evoluir para a própria doença, ou deixando uma oportunidade para a remissão e manutenção das funções cognitivas.

A presença da CCL leva tanto à perda da memória quanto ao desenvolvimento de estados de ansiedade, sendo essa a única alteração psiquiátrica encontrada em indivíduos com CCL em um estudo americano (FORSELL; PALMER; FRATIGLIONI, 2003). Além disso, já foi demonstrado que perda de memória e ansiedade estão diretamente relacionados e são os principais fatores para o desenvolvimento de déficit cognitivo no indivíduo idoso, mais do que outros fatores de risco como a própria idade, o nível educacional e o estado civil. De forma indireta, a perda de memória e o aumento de ansiedade levam à instalação de estados depressivos, o que também contribui com o declínio cognitivo na velhice (SINOFF; WERNER, 2003).

2 HIPÓTESE

Diante do exposto, sabemos que o tratamento com microdoses de lítio melhora a manutenção da memória, neuroproteção e redução da ansiedade em modelo animal para a doença de Alzheimer. Assim, acreditamos que esse tratamento pode influenciar os mecanismos de manutenção da memória e a redução da ansiedade de camundongos com envelhecimento acelerado.

3 OBJETIVO

Os objetivos desse trabalho foram:

1. Comparar as respostas comportamentais de camundongos com envelhecimento acelerado e camundongos com envelhecimento natural, de mesma idade.
2. Avaliar os efeitos do tratamento com microdoses de lítio para a memória e para o estado ansioso de camundongos com envelhecimento acelerado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem SAMP-8 ("senescence-accelerated mouse prone") que possuem envelhecimento acelerado. A escolha da utilização de fêmeas no presente trabalho se dá pelo fato de que vários trabalhos com seres humanos e modelos animais apontarem para a maior susceptibilidade de indivíduos do sexo feminino apresentarem sinais patofisiológicos e comportamentais de demência, devido à súbita queda dos hormônios estrógeno e progesterona na circulação sanguínea (LI; SINGH, 2014). Os animais vivem, em média, metade do tempo normal de camundongos (cerca de 12 meses). Nesse período, apresentam declínios de aprendizagem e memória, distúrbios emocionais, ritmos circadianos anormais e atrofia cerebral (TAKEDA, 1999). Foram utilizados, também, camundongos fêmeas da linhagem SAMR-1 ("senescence-accelerated mouse resistent"), controles naturais dos animais SAMP-8. Os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas com água e comida *ad libitum* em temperatura ambiente entre 24°C a 26°C e umidade de 55%. Cada gaiola abrigava 2 a 5 animais. Esses animais permaneceram em um ciclo claro-escuro de 12 horas com luzes acesas a partir das 6 horas da manhã até completarem 10 meses de idade.

Quando os animais completaram 10 meses ou na ocorrência de morte natural, o cérebro e sangue foram coletados e congelados a -80ºC para análises moleculares posteriores.

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, em colaboração com o Prof. Dr. Hudson de Sousa Buck.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, sob número 12/2016.

Grupos Experimentais

Os animais SAMP-8 foram divididos em 2 grupos:

1) Controle, V.O.: animais que receberam somente água filtrada durante todo o processo de envelhecimento (n = 12).

2) Lítio, V.O.: animais que receberam carbonato de lítio na dose de 0,25 mg/kg (n = 12).

Como controle dos animais SAMP-8, foram utilizados os animais resistentes ao envelhecimento acelerado SAMR-1 (“senescence-accelerated mice-resistant”, n = 10).

Tratamento com microdose de lítio

O lítio foi administrado na forma de carbonato de lítio, na dose de 0,25 mg/kg, conforme descrito anteriormente. Foi feita uma solução de carbonato de lítio em água filtrada a 1,5 mg/L, que corresponde a 0,006 mEq de lítio/Kg e oferecida *ad libitum* aos animais. A dose final ajustada foi de 0,005 mg/dia/animal, o que corresponde a 0,25mg/Kg (NUNES et al., 2015). Essa concentração foi estabelecida a partir da avaliação da quantidade média de água ingerida por camundongo (em torno de 5 mL/camundongo/dia) em trabalho anterior, onde o volume de água com lítio ingerido por animal conferiu com o volume necessário para que a dose diária de lítio pretendida fosse administrada. A quantidade ingerida foi monitorada semanalmente (SCHÖWE, 2015).

O tratamento foi iniciado quando os animais tinham 2 meses de idade (em fevereiro de 2017) e mantidos até os animais completarem 10 meses de idade.

Os animais SAMR-1 não foram submetidos ao tratamento com lítio, pois em estudos preliminares com animais selvagens de outras espécies, não foi observada alteração de memória ao longo do envelhecimento (Nunes et al., 2015).

4.1 Avaliação comportamental da memória espacial

A memória espacial foi avaliada de acordo com trabalho anterior do grupo (BARALDI et al., 2013), utilizando-se o “labirinto de Barnes” (Figura 2). Esse labirinto é composto por uma prancha circular branca com buracos distribuídos radialmente, circundada por uma parede escura onde quatro símbolos (cruz, quadrado, círculo e triângulo) amarelos foram dispostos em sequência. Uma caixinha preta com maravalha (caixa de escape) foi colocada em baixo de um dos buracos (sempre o mesmo para cada animal). O animal foi colocado no centro da prancha, onde permaneceu por 1 minuto em uma caixa de acrílico para reconhecer o ambiente a sua volta. Sobre a prancha foi colocada uma luz (70 W) considerada como estímulo incômodo para o roedor. Em seguida, ele foi solto e teve, no máximo, cinco minutos para encontrar a caixa de escape, onde foi deixado por mais um minuto, com as luzes da sala apagadas e a caixa fechada. A latência para encontrar a caixa de

escape foi registrada. O teste é baseado na preferência inata de roedores por lugares escuros e fechados. Na fase de aquisição da informação, quando os animais estavam com dois meses de idade, passaram por uma prova por dia, durante cinco dias. O teste para avaliação da consolidação da memória foi realizado uma semana após a fase de aquisição e, em seguida, a cada três meses até a morte do animal.

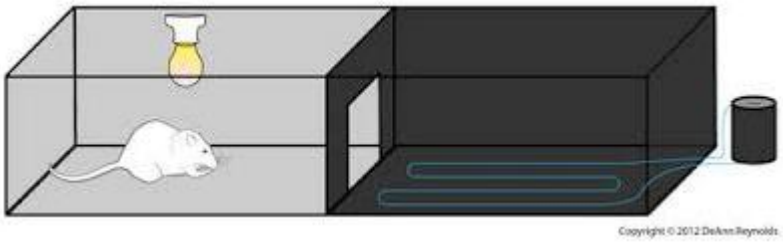
Figura 2 - Labirinto de Barnes desenvolvido para avaliação da memória espacial de camundongos. A caixa de escape fica sob um dos buracos.

Foto: Alessandra Macedo

4.2 Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo

Foi utilizado o equipamento de esquiva inibitória (modelo Ugo Basile, Itália), que consiste de uma gaiola dividida em dois compartimentos iguais, sendo um iluminado, e outro escuro, separados por uma porta-guilhotina (Figura 3). Os animais foram colocados individualmente na parte iluminada da gaiola e foi medida a latência, em segundos, para que os mesmos passassem para o compartimento escuro. Estando no lado escuro, o animal recebeu um estímulo elétrico nas patas de 0,5 mA por 2 seg, deflagrado pelas barras metálicas localizadas no chão desse compartimento. A latência máxima permitida para cada animal foi de 300 seg. Foi realizado uma sessão de aquisição e uma sessão de teste 24 horas após a aquisição para avaliação da memória de longa duração. A retenção da memória de longa duração também foi avaliada a cada três meses.

Figura 3 - Representação gráfica da caixa de esquiva inibitória, onde o animal é colocado para avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo.



Fonte: igf-ii-memory.weebly.com

4.3 Avaliação do comportamento de ansiedade

O comportamento de ansiedade foi verificado de três formas:

1) No labirinto de Barnes foram registrados o tempo de exploração do animal na periferia do equipamento e no centro. Os roedores possuem um comportamento estereotipado de permanecerem na periferia de um local, caso estejam mais ansiosos procurando, por exemplo, uma saída deste local. Caso não estejam ansiosos, permanecem mais tempo explorando o centro do equipamento.

2) Outro equipamento utilizado para medir o nível de ansiedade foi o labirinto em cruz elevado (LCE). Esse equipamento consiste em dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) cruzados por dois braços fechados (50 x 10 cm, paredes com 40 cm de altura). Os braços são conectados a um quadrado central (10 x 10 cm) que confere uma aparência de cruz ao labirinto. O labirinto é mantido a, aproximadamente, 50 cm do chão (Figura 4).

Os parâmetros avaliados foram a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, nos braços fechados e no centro do equipamento. Foram registrados, também, o número de entradas nos braços abertos, o número de entradas nos braços fechados e o número de “head dippings” (comportamento de mergulhar a cabeça para explorar o ambiente fora do equipamento). Quanto mais o animal entrar e/ou quanto mais tempo permanecer nos braços abertos, menor o nível de ansiedade. Da mesma forma, quanto maior o número de “head dippings”, menor o nível de ansiedade.

Figura 4 - Labirinto em cruz elevado. Equipamento utilizado para medir o nível de ansiedade de roedores

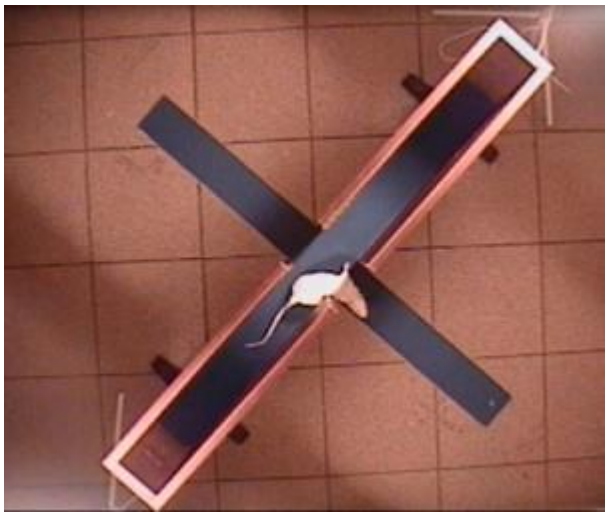


Foto: Divulgação/FFCLRP.

3) “Burrowing” defensivo, ou comportamento de entocar-se. Esse é um comportamento inato aos roedores, que o fazem em ambientes de estresse e perigo, refletindo o nível de ansiedade do animal. Assim, animais ansiosos tendem a ser bons escavadores. Por outro lado, animais sob efeitos farmacológicos ansiolíticos, tendem a escavar menos pois não se sentem ameaçados.

Para avaliar se os tratamentos influenciaram esse comportamento, os camundongos foram colocados individualmente em caixas contendo um tubo de PVC com a abertura frontal elevada (Figura 5). Dentro do tubo foram colocados 200g de ração comercial e os animais foram deixados nesse ambiente por duas horas (no final da tarde). Após esse período, a quantidade de ração escavada foi avaliada.

Figura 5 - Tubo de PVC com ração para roedores preparado para o teste de “entocar-se”.

Fonte: Deqacon, R. J. Vis. Exp. (59), e2607, doi:10.3791/2607, 2012.

4.4 Análise Estatística

Para os experimentos de comportamento em labirinto de Barnes, os dados foram expressos como médias ± erros-padrão e submetidos à análise de variância de duas vias, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas, sendo “tratamento” e “tempo” os fatores de avaliação.

Para os ensaios em LCE e "Burrowing" defensivo, os dados foram expressos como médias ± erro-padrão e submetidos ao teste t de Student para comparação dos resultados entre SAMR-1 e SAMP-8 e entre os SAMP-8 tratado ou não com lítio.

Para os ensaios em esquiva inibitória, os dados foram expressos como medianas e intervalos interquartis e analisados por teste de Wilcoxon (para amostras não-paramétricas e não-pareadas - entre SAMR-1 e SAMP-8) e entre os SAMP-8 tratado ou não com lítio.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 6.0) e as diferenças foram consideradas significativas quando $\rho < 0,05$.

5 RESULTADOS

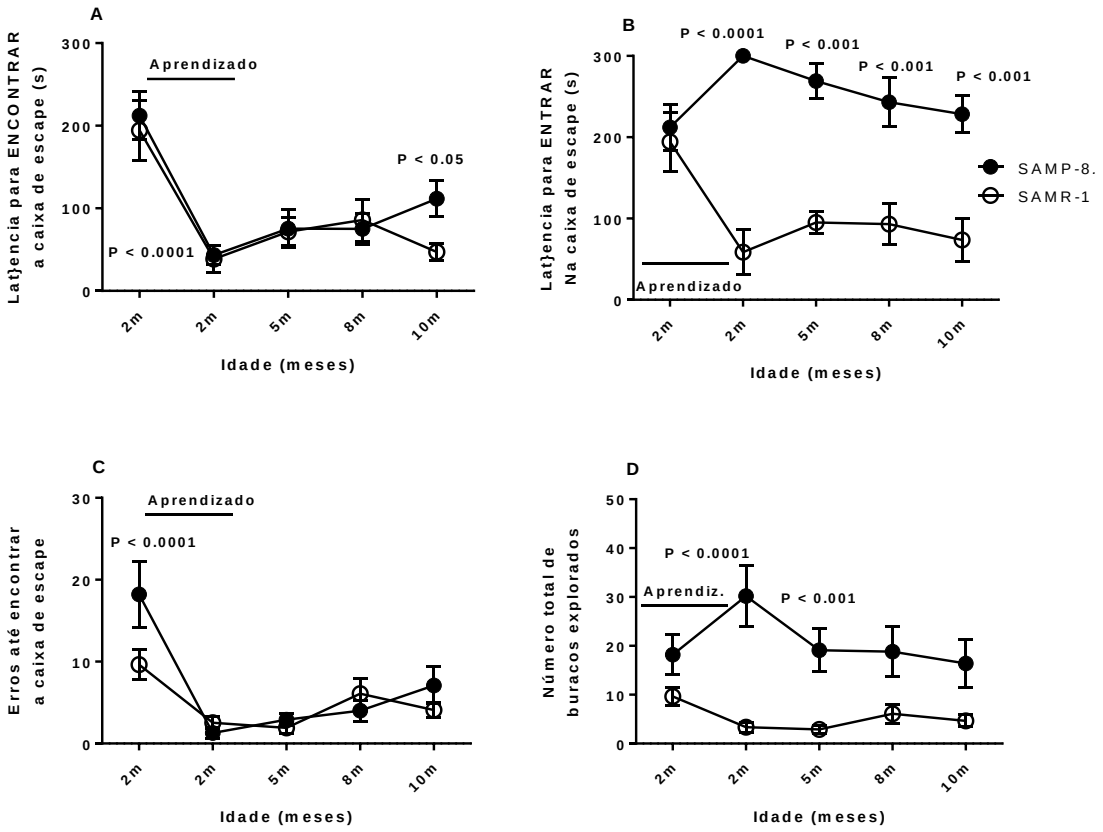
5.1 Avaliação do tratamento com íons de lítio para a memória espacial.

Tanto os animais SAMP-8 quanto SAMR-1 apresentaram capacidade de aprender a tarefa, uma vez que apresentaram redução significativa do tempo para achar a caixa de escape ao longo dos cinco dias de aprendizado [$F_{(4, 228)} = 36,08$, $P < 0,0001$]. A memória da localização da caixa de escape, medida pela latência que o animal leva para achar a caixa, foi mantida em ambos os grupos até os 10 meses de idade. Como pode ser observado na Figura 6A, não houve diferença significativa no tempo para achar a caixa de escape, nos dois grupos.

Por outro lado, as fêmeas SAMR-1 apresentaram um comportamento de "entocar-se", inédito, ou seja, que nunca tinha sido observado por nosso grupo em outras linhagens de camundongos. Na verdade, esse é um comportamento que se espera que roedores façam durante o período de claro. Esse comportamento foi significativamente diferente do observado com as SAMP-8 (Figura 6B), pois esses camundongos achavam a caixa e continuavam a explorar o labirinto de forma frenética, aparentemente em uma tentativa de escapar. O comportamento de entocar-se das SAMR-1 foi mantido até o último momento de observação (aos 10 meses de idade).

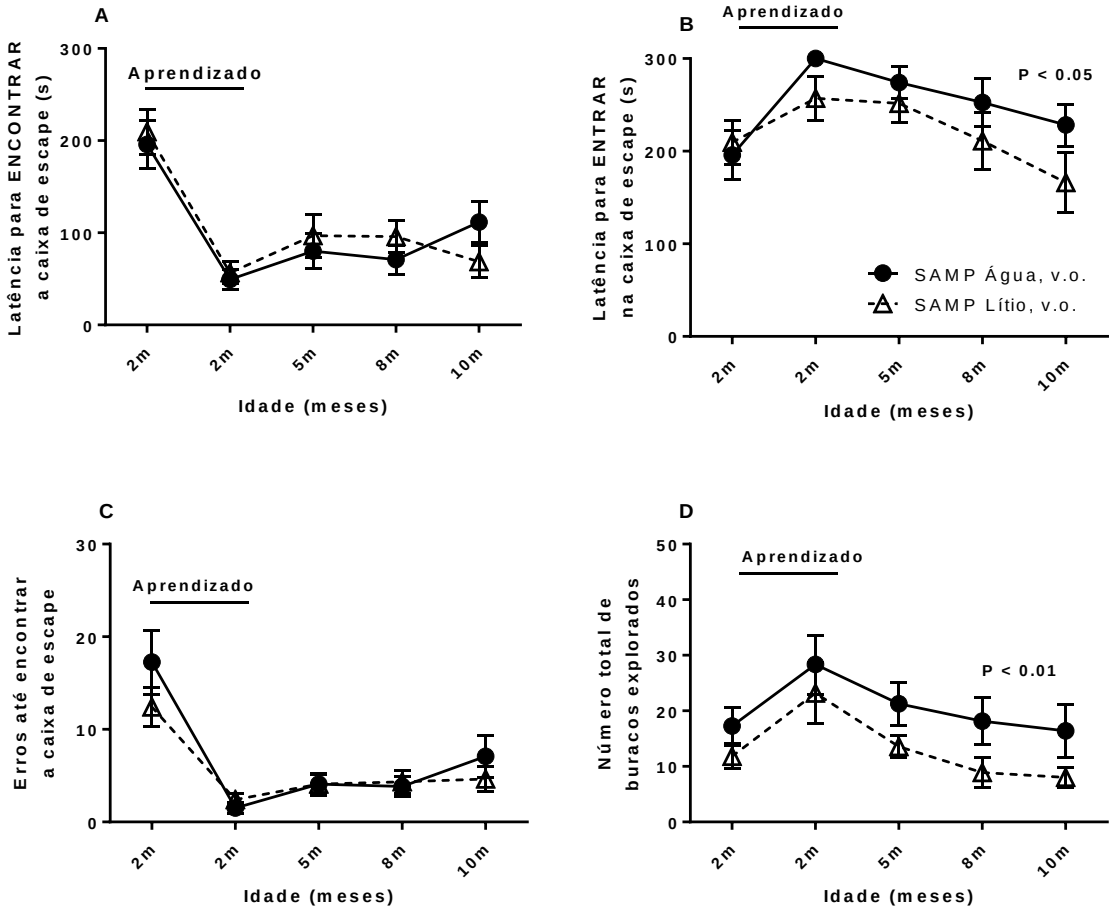
O número de erros que os animais cometeram para achar a caixa de escape também foi registrado e as fêmeas de ambas as linhagens apresentaram o mesmo comportamento (Figura 6C), ou seja, esse número foi reduzindo durante a sessão de aquisição da tarefa ("Learning") e foi mantido ao longo do envelhecimento dos animais. Por outro lado, o número total de erros cometidos até que as fêmeas entrassem na caixa de escape (ou até que o tempo máximo de observação no equipamento – 300 seg – se esgotasse), foi significativamente menor no grupo SAMR-1, em relação ao grupo SAMP-8 (Figura 6D). Após achar a caixa de escape, as fêmeas SAMP-8 continuaram a explorar o labirinto e os buracos errados, sugerindo um comportamento ansioso maior que os animais SAMR-1.

Figura 6 - Memória espacial de animais SAMP-8 e SAMR-1 fêmeas, medida em labirinto terrestre de Barnes. A) Tempo para achar a caixa de escape. B) Tempo para entrar na caixa de escape. C) Número de buracos errados explorados até o animal achar a caixa de escape. D) Número total de buracos errados explorados. Os símbolos e barras verticais são as médias ± erros-padrão.



Após o período de aprendizado da tarefa, parte dos animais SAMP-8 foi tratada com a microdose de lítio. Foi observado que o tratamento com lítio não interferiu no tempo para achar a caixa de escape ou no número de buracos errados explorados até que os animais achassem a caixa (Figura 7 A e C). Porém, ao longo do envelhecimento, com o tratamento, o tempo para que os animais entrassem na caixa de escape foi sempre menor, em relação aos animais SAMP-8 não tratados (Figura 7B), sendo significativo aos 10 meses de idade. O número total de buracos errados explorados também foi menor nos animais tratados com lítio (Figura 7D).

Figura 7- Memória espacial de animais SAMP-8 tratados com água (bolas pretas) e com microdose de lítio (triângulos brancos), medida em labirinto terrestre de Barnes. A) Tempo para achar a caixa de escape. B) Tempo para entrar na caixa de escape. C) Número de buracos errados explorados até o animal achar a caixa de escape. D) Número total de buracos errados explorados. Os símbolos e barras verticais são as médias ± erros-padrão.



5.2 Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo

No teste subsequente à sessão de aquisição, quanto maior a latência de permanência no lado claro da caixa, melhor a memória do animal. Na sessão de aquisição todos animais apresentaram tempo semelhante para adentrar o lado escuro da caixa, não havendo diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 **-** Valores de medianas e intervalos interquartis da latência (s) para os animais entrarem no lado escuro da caixa de esquiva inibitória.

	Sessão de Aquisição	Sessão de Teste	Reteste após 1 semana
SAMR-1	18,3 [10,5/47,1]	69,6 [35,8/248,1]*	300,0 [86,2/300,0][a]
SAMP-8 Água	38,7 [21,9/77,1]	161,9 [47,1/205,1]*	73,55 [57,70/132,9][b]
SAMP-8 Lítio	29,5 [22,5/39,4]	92,5 [27,8/277,4]*	133,1 [62,5/196,8][c]

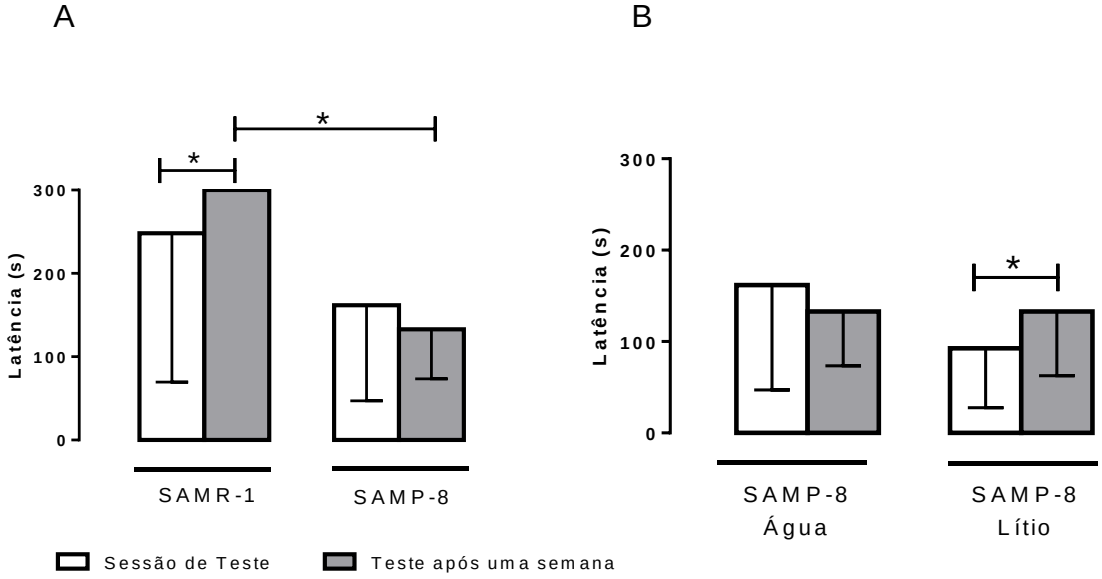
*: P < 0,05 entre sessão de teste e sessão de aquisição
[a]: P < 0,05 entre reteste 1 semana e sessão de teste.
[b]: P < 0,05 entre SAMR-1 e SAMP-8.
[c]: P < 0,05 entre reteste 1 semana e sessão de teste.

Na sessão de teste, realizado 24 horas após a aquisição, todos os animais lembraram da tarefa, apresentando aumento significativo da latência para entrar no lado escuro do equipamento, em comparação à latência registrada na sessão de aquisição.

Após uma semana, quando o teste foi novamente refeito (reteste), foi observado que os animais SAMR-1 apresentaram um aumento significativo da latência para entrar no lado escuro da caixa de 1,4 vezes ($\rho<0,05$), ao passo que os animais SAMP-8 (água) não mostraram lembrar da tarefa. A resposta dos animais SAMP-8 foi 75,5% menor que a resposta dos animais SAMR-1 (Figura 8A, Tabela 2).

Com o tratamento com a microdose de lítio foi observado um aumento significativo de 2,2 vezes ($\rho<0,05$) no tempo para entrar no lado escuro da caixa na sessão reteste após uma semana, mostrando que o tratamento promoveu uma melhora na memória desses animais (Figura 8B, Tabela 2).

Figura 8 - Memória aversiva registrada em equipamento de esquiva inibitória. **A)** Comparação entre SAMR-1 e SAMP-8 não tratado. **B)** Comparação entre SAMP-8 tratado ou não com íons de lítio por via oral. Os histogramas e barras verticais são as medianas e intervalos interquartis. *: P < 0,05.

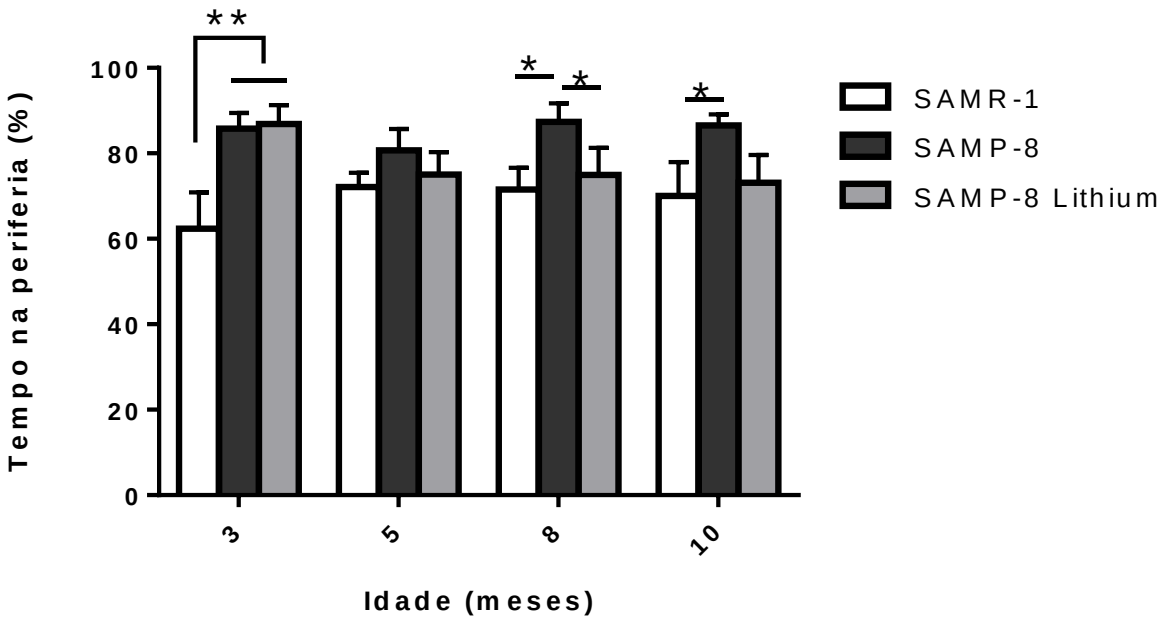


5.3 Avaliação do tratamento com íons de lítio para o comportamento de ansiedade.

Para avaliar os efeitos do tratamento com íons de lítio para o comportamento de ansiedade, o tempo que os animais exploraram a periferia do labirinto de Barnes e o tempo que exploraram o centro do mesmo foi registrado. Os roedores, em geral, possuem um comportamento nato, classificado como “estereotipado”, de tentar escapar de locais iluminados. Esse comportamento estereotipado é relacionado à maior ansiedade, quando os animais permanecem mais tempo na periferia de um campo aberto.

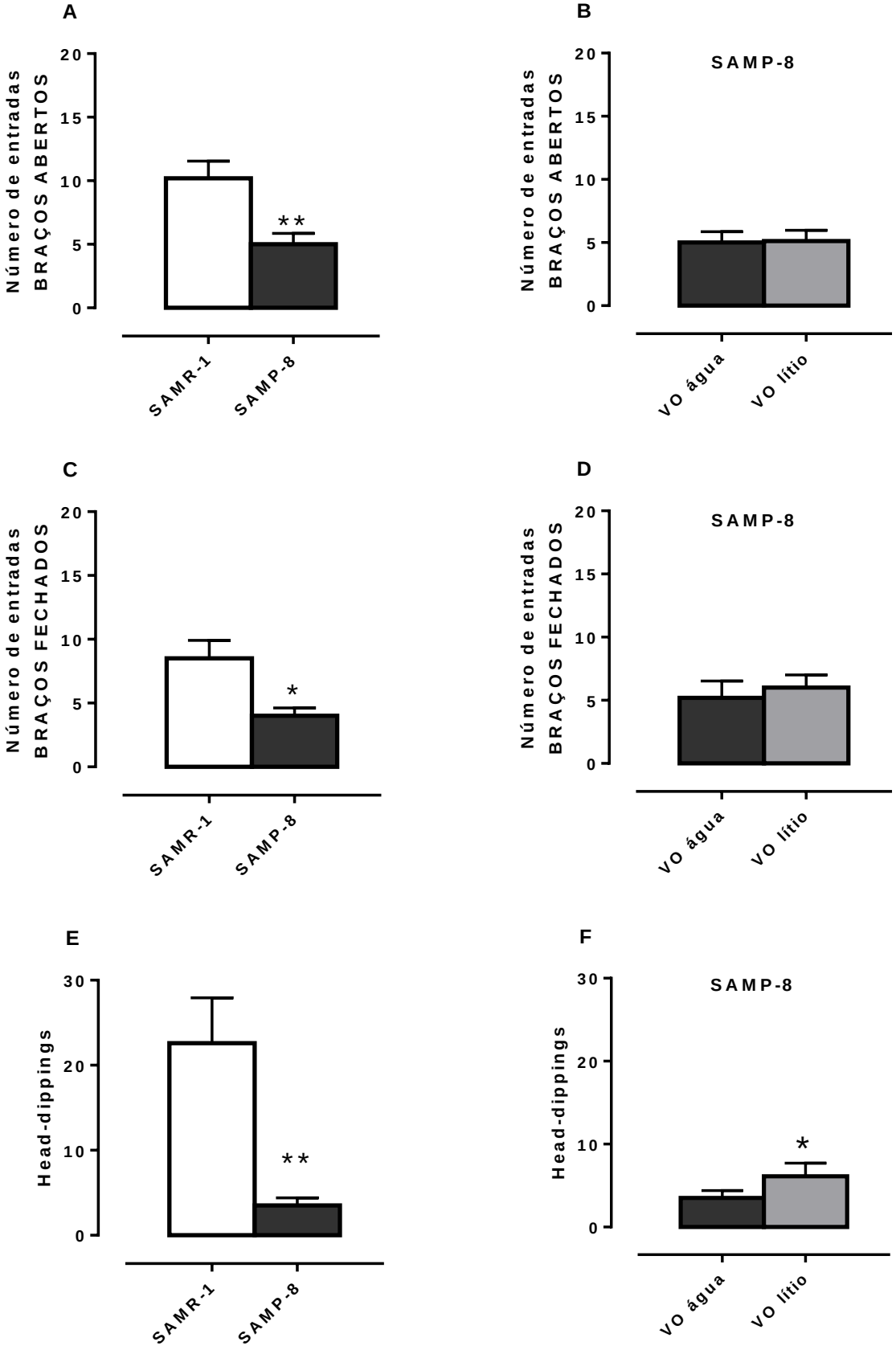
Na análise do tempo gasto na periferia do equipamento, foi observado que os animais SAMP-8, aos três meses de idade permaneceram tempo significativamente maior (P < 0,01) na periferia do labirinto, em relação aos animais SAMR-1. Esse comportamento foi mantido nos animais SAMP-8 não tratados quando o teste foi repetido aos 8 e 10 meses de idade (P < 0,05). Por outro lado, o tratamento com a microdose de lítio fez com que os animais SAMP-8 tratados permanecessem menor tempo na periferia do equipamento, não sendo diferente do grupo SAMR-1 (Figura 9).

Figura 9 - Comportamento estereotipado medido em labirinto terrestre de Barnes. Os histogramas e barras verticais são as médias ± erros-padrão. *: P < 0,05; **: P < 0,01.



Em relação ao número de entradas nos braços, houve redução significativa de entradas nos braços abertos tanto dos animais não tratados quanto dos tratados em relação aos animais SAMR-1, sugerindo que o tratamento com o lítio não alterou esse comportamento (Figura 10 A, B, C e D). Por outro lado, foi observada uma redução significativa no número de “head-dippings” (mergulhos da cabeça para exploração do ambiente) em animais SAMP-8, quando comparados com os controles (P<0,01, Figura 11E). O tratamento com o carbonato de lítio restabeleceu esse comportamento exploratório (P<0,05, Figura 11F).

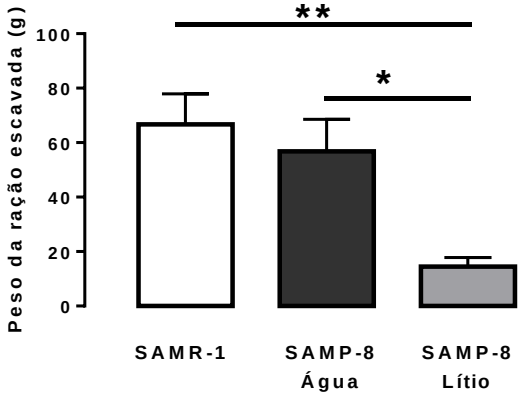
Figura 10- Número de entradas nos braços abertos (**A, B**), nos braços fechados (**C, D**) e número de "head-dippings" (**E, F**) registrados em Labirinto em Cruz Elevado. Os histogramas e barras verticais são as médias ± erros-padrão. *: P < 0,05; **: P < 0,01.



Na avaliação do comportamento de ansiedade pelo método de “burrowing”, foi observado que animais SAMR-1 ou SAMP-8 apresentaram comportamentos parecidos, não havendo diferença estatística entre a quantidade de ração escavada (Figura 12).

Por outro lado, o tratamento de animais SAMP-8 com íons de lítio durante 8 meses reduziu significativamente o comportamento de escavação, indicando mais uma vez um comportamento menos ansioso desses animais em relação aos animais SAMP-8 não tratados (P < 0,05, Figura 11). Da mesma forma, esse comportamento também foi significativamente menor do observado em animais SAMR-1 (p < 0,01, Figura 11).

Figura 11 - Comportamento de “entocar-se” de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 tratados ou não com íons de lítio. Os histogramas e barras verticais são as médias ± erros-padrão. *: P < 0,05; **: P < 0,01



6 DISCUSSÃO

Com o advento do aumento da expectativa de vida no mundo e, de uma forma mais abrupta e acelerada, no Brasil, surge uma importante preocupação com a qualidade desses anos vividos a mais. É de fundamental importância que a ciência se empenhe em tentar evitar que o aumento da longevidade se traduza em declínio da saúde. Os riscos e agravos de doenças que acometem mais frequentemente os idosos são alvo de inúmeras pesquisas, que têm por finalidade promover um envelhecimento saudável para essa população.

Entre as doenças mais comuns que acometem essa faixa etária, a Doença de Alzheimer é a principal doença que afeta a função cognitiva, aprendizado e memória. A diminuição da atividade do sistema colinérgico é considerada a hipótese mais aceita para a etiologia da DA. A abordagem terapêutica utilizada no tratamento da DA até o momento compreende os inibidores da colinesterase, enzima que degrada a acetilcolina. Esses fármacos, no entanto, são capazes de mitigar a progressão da perda da memória, mas não conseguem reverter perdas funcionais e causam efeitos colaterais colinérgicos (RANG; DALE, 2012).

Diante desse cenário, uma alternativa ou adjuvante no tratamento da perda de memória na DA seria de grande valor terapêutico.

O efeito de microdoses de lítio na alteração de características patológicas da Doença de Alzheimer, como a estabilização da memória em pacientes com DA, já foi comprovado por estudos anteriores (NUNES et al, 2013), embora ainda exista muito a ser avaliado no que se refere a aspectos moleculares com o tratamento com a microdose de íons de lítio.

No presente estudo, para avaliar o efeito do tratamento com microdoses de lítio sobre a memória espacial, foi realizado o teste do Labirinto de Barnes. A linhagem SAMP-8 desenvolve um déficit de aprendizado e memória precoce, entre 8 e 10 meses de idade além de outras características similares àquelas apresentadas na DA, sendo também considerada um modelo animal para essa doença (YAGI et al., 1988; TAKEDA, 1999). O teste mostrou que o grupo SAMP-8 e o grupo SAMR-1 aprenderam o teste, pois houve diminuição do tempo para achar a caixa de escape de forma semelhante entre os grupos nos testes de aprendizagem subsequentes. No entanto, as fêmeas SAMP-8, mesmo após encontrar a caixa de escape continuavam explorando o labirinto, não apresentando o comportamento de

“entocar-se” como o fizeram as fêmeas SAMR-1, sugerindo um comportamento mais ansioso. É possível que essas fêmeas tenham apresentado esse comportamento por serem animais que possuem características de envelhecimento acelerado, o que não é o caso dos animais SAMR-1.

O número de erros para encontrar a caixa de escape foi reduzindo durante a fase de aquisição e foi mantido de forma similar em ambos os grupos, à medida que os animais envelheciam, sugerindo que a memória foi mantida.

O grupo SAMP-8 tratado com a microdose de lítio, comparado ao do SAMP-8 não tratado, apresentou menor tempo para adentrar a caixa de escape em todo o período, sendo significativo aos 10 meses, sugerindo um efeito do lítio na manutenção da memória ao longo do envelhecimento, considerando que ambos os grupos apresentam envelhecimento acelerado (figura 7B). Esse resultado corrobora o estudo de NUNES et al. (2015), que mostrou que a microdose de lítio pode ser eficiente em melhorar o aprendizado, a consolidação da memória e manter a memória espacial em animais transgênicos para a DA – TG-B6.Cg-Tg (PDGFB-APPSwInd).

O teste de Labirinto de Barnes foi usado em estudo recente para avaliar o comportamento de camundongos SAMP-8 e SAMR-1, evidenciando o declínio progressivo de aprendizado e memória do SAMP-8 em relação ao SAMR-1 (ZHOU et al., 2018)

Outros testes para avaliar a memória espacial da linhagem SAMP-8 são utilizados, sendo um deles o Labirinto Aquático de Morris. Vários estudos demonstraram declínio de aprendizagem e memória de início precoce no SAMP-8 utilizando esse teste (LIN et al., 2014; MARKOWSKA; SPANGLER; INGRAM, 1998; MAURICE et al., 1996; MIYAMOTO et al., 1986). Um estudo comparou camundongos SAMP-8 jovens (4 meses) e velhos (15 meses) com camundongos SAMR-1 da mesma idade, usando o teste do Labirinto Aquático de Morris para avaliar a memória espacial, mostrou um declínio mais acentuado da memória espacial relacionada a idade nos camundongos SAMP-8 em comparação aos camundongos SAMR-1 (MARKOWSKA; SPANGLER; INGRAM, 1998). Esses estudos fundamentam o resultado do presente trabalho que mostra uma melhor performance do animal velho tratado com íons de Lítio (SAMP-8 aos 10 meses) no teste do Labirinto de Barnes em comparação ao SAMP-8 da mesma idade não tratado.

Em relação à memória relacionada a estímulo aversivo, os animais SAMP-8 não tratados apresentaram menor latência para entrar na caixa em relação ao SAMR-1. No entanto, com o tratamento, os animais SAMP-8 aumentaram a latência no teste após uma semana em comparação ao seu teste anterior, sugerindo manutenção da memória aversiva de longo prazo. O grupo não tratado diminuiu a latência para entrar na caixa escura no teste após uma semana em relação ao seu teste prévio, indicando não lembrar do teste. Esse teste confirma os achados do estudo com animais transgênicos para a DA – TG – B6.Cg-Tg (PDGFB-APPSwlnd), que também foram tratados com a microdose de lítio (NUNES et al., 2015a). A esquiva inibitória foi usada em estudo que avaliou o declínio de aprendizado e memória de camundongos SAMP-8 e SAMR-1 de 1, 3, 5, 8 e 10 meses de idade. O resultado mostrou declínio gradativo da latência para entrar no compartimento escuro a partir dos 5 meses de idade nos camundongos SAMP-8, enquanto a latência dos camundongos SAMR-1 manteve-se constante desde o primeiro mês até os 10 meses de idade (SAWANO et al., 2013). Outros estudos também evidenciaram a diminuição da memória dos camundongos SAMP-8 ao longo do envelhecimento por meio desse teste (FLOOD; E. MORLEY, 1997; MIYAMOTO, 1997; WANG et al., 2017; YAGI et al., 1988).

Ansiedade e alterações neuronais no hipocampo foram detectadas em modelos de animais jovens que mimetizam a DA e que ainda não apresentavam deposição de placas de amiloide, sugerindo que a ansiedade pode favorecer o surgimento da DA e, consequentemente, déficit cognitivo (BEAUQUIS et al., 2014). Acredita-se que o desempenho em testes de aprendizado e memória seja afetado pelo aumento da ansiedade ao longo da vida em humanos e animais (WETHERELL et al., 2002; YAU et al., 2002).

A ansiedade foi avaliada nesse estudo por meio de três testes de comportamento e o uso do lítio mostrou uma diminuição do estado ansioso dos animais em todos esses testes.

Os animais SAMP-8 não tratados permaneceram mais tempo na periferia do labirinto de Barnes em relação ao SAMR-1, indicando um comportamento mais ansioso que o dos animais do grupo controle. No entanto, os animais SAMP-8 tratados apresentaram um comportamento semelhante ao do SAMR-1 ao explorar mais o centro da plataforma, sugerindo que a microdose de lítio preveniu o desenvolvimento de comportamento de ansiedade esperado nos animais com

envelhecimento acelerado, em comparação com os animais controle com envelhecimento normal.

No teste de Labirinto em Cruz Elevado, os animais SAMP-8 apresentaram menor número de entradas nos braços abertos quando comparados aos SAMR-1, sugerindo um comportamento ansioso desses animais (BUTTERFIELD; POON, 2005).

Um estudo avaliou o comportamento de ansiedade pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado em camundongos machos e fêmeas aos 2, 6 e 10 meses de idade, mostrando que o SAMP-8 apresentou aumento da ansiedade ao longo do envelhecimento. (CHEN et al., 2007). Porém, no presente trabalho, o carbonato de lítio em microdose não alterou esse comportamento, pois os SAMP-8 tratados não apresentaram aumento significativo do número de entradas em ambos os braços comparados com o grupo SAMP-8 sem tratamento. Por outro lado, o número de "head-dippings", que representa um comportamento de exploração audacioso nos animais e indica redução de ansiedade quando em grande quantidade, foi significativamente maior em animais SAMP-8 tratados com lítio.

O tempo de permanência nos braços fechados sugere um comportamento mais ansioso dos animais. Os animais SAMP-8 apresentaram maior tempo de permanência nos braços fechados do labirinto em comparação com SAMR-1, confirmando um estado ansioso. No entanto, com o tratamento, os animais SAMP-8 apresentaram um comportamento diferente dos SAMP-8 não tratados, permanecendo menos tempo no braço fechado e mais tempo nos braços abertos, corroborando o observado com o comportamento de "head-dipping" e sugerindo um efeito ansiolítico do carbonato de lítio em microdose.

Outro teste utilizado para avaliar a ansiedade foi o teste de “burrowing”, que reflete o comportamento aumentado ou diminuído do animal em escavar, dependendo do seu nível de ansiedade (KACZMARCZYK et al., 2013; RUTTEN et al., 2014). Mudanças no comportamento de escavação foram interpretadas como comportamento de ansiedade, sendo a escavação uma ação utilizada para se esconder de predadores e esconder comida (DEACON, 2006). No nosso trabalho, foi observado um efeito ansiolítico após tratamento com a microdose de lítio nos animais tratados a longo prazo, comparados aos animais SAMP-8 sem tratamento algum. Esse estudo também mostrou resultados que corroboram o estudo realizado anteriormente por nosso grupo (NUNES et al., 2015), onde foi observado diminuição

dos níveis de ansiedade com o tratamento com íons de lítio, tanto em animais transgênicos para a doença de Alzheimer quanto em camundongos C57Bl/6.

7 CONCLUSÃO

Foi observado que os animais SAMP-8 apresentaram déficits de memória espacial e memória relacionada ao estímulo aversivo. Corroborando os achados anteriores do grupo com animais transgênicos para a doença de Alzheimer, o tratamento com microdose de lítio promoveu melhora de ambos os comportamentos.

Os animais SAMP-8 também apresentaram aumento de ansiedade, comportamento que foi reduzido com o tratamento proposto.

Dessa forma, conclui-se que o lítio em microdose pode ser um tratamento adjuvante à farmacoterapêutica atual da Doença de Alzheimer, para a manutenção da memória e redução da ansiedade, associadas ao desenvolvimento do transtorno.

REFERÊNCIAS[1]

ABRÃO, G. S; TORICELLI, M; MALERBA, H. N; MACEDO, A.; PEREIRA, A. A. R.; CHINTA, S.; RANE, A.; CHEMOLI, M.; BUCK, H. S.; ANDERSEN, J. K.; Viel, T.A. Translational evidence of microdose lithium chronic and acute effects for central nervous system healthy aging. *Fase final de redação.*

AKIGUCHI, I. et al. SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. **Neuropathology**, v. 37, n. 4, p. 293–305, 2017.

ALICIA. L., M.; EDWARD .L., S.; DONALD .K., I. Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse (SAM P8 and R1). **Physiology and Behavior**, v. 64, n. 1, p. 15–26, 1998.

ANWYL, R. Metabotropic glutamate receptors: Electrophysiological properties and role in plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–120, 1999.

ARAUJO VIEL, T. et al. Chronic Infusion of Amyloid-β Peptide and Sustained Attention Altered α7 Nicotinic Receptor Density in the Rat Brain. **Current Alzheimer Research**, v. 9, n. 10, p. 1210–1220, 2012.

BARALDI, T. et al. Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice. **Experimental Gerontology**, 2013a.

BARALDI, T. et al. Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 8, p. 831–838, 1 ago. 2013b.

BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. Object-in-place associative recognition memory depends on glutamate receptor neurotransmission within two defined hippocampal-cortical circuits: A critical role for AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, perirhinal, and prefrontal cortices. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 2, p. 472–481, 2015.

BARKUS, C. et al. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. **European Journal of Pharmacology**, 10 jan. 2010a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836379>. Acesso em: 14 maio. 2017

BARKUS, C. et al. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. **European Journal of Pharmacology.** Elsevier, 10 jan. 2010b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299909009030>. Acesso em: 27 fev. 2018

BAUDRY, M. et al. The Biochemistry of Memory: The Twenty-Six Year Journey of a

[1]De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023 (2002).

“New and Specific Hypothesis”. **Neurobiol Learn Mem**, v.95, n. 2, p. 125-133.

BEAUQUIS, J. et al. Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer’s disease. **Hippocampus**, v. 24, n. 3, p. 257–269, 2014.

BHATTACHARYYA, S. Inside story of Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 77, p. 205–212, ago. 2016.

BOCCIA, M. M. et al. Hippocampal alpha7 nicotinic receptors modulate memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. **Neuroscience**, v. 171, n. 2, p. 531–543, 1 dez. 2010.

BUTTERFIELD, D. A.; POON, H. F. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer’s disease. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 10, p. 774–783, 2005.

CANÇADO, et al. Envelhecimento cerebral. In: FREITAS, E. V. et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013. P. 232-255.

CANUDAS, A. M. et al. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 12, p. 1300–1304, 2005.

CHAIMOWICKS, F., CAMARGOS, M. C. S. Envelhecimento e Saúde no Brasil. In: FREITAS, E. V. et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013. P. 153-184.

CHEN, G. H. et al. Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. **Physiology and Behavior**, v. 91, n. 5, p. 644–651, 2007.

CHENG, X. RUI; ZHOU, W. XIA; ZHANG, Y. XIANG. The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer’s disease animal model. **Ageing Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 13–37, 2014.

CITRI, A.; MALENKA, R. C. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v. 33, p. 18–41, 2008.

CONEJERO-GOLDBERG, C.; DAVIES, P.; ULLOA, L. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: A link between inflammation and neurodegeneration. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** Pergamon, , 1 jan. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763407001418>. Acesso em: 27 fev. 2018

DEACON, R. M. J. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. **Nature Protocols,** v.1, n.1, p.118-121, 2006. Disponível em:

<http://www.nature.com/natureprotocols>. Acesso em: 19 ago. 2019.

DEL VALLE, J. et al. Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 19, n. 4, p. 1303–1315, 2010.

DEL VALLE, J. et al. Dendritic spine abnormalities in hippocampal CA1 pyramidal neurons underlying memory deficits in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 32, n. 1, p. 233–240, 2012.

FERRAGUTI, F.; CREPALDI, L.; NICOLETTI, F. Metabotropic Glutamate 1 Receptor: Current Concepts and Perspectives. **Pharmacological Reviews**, 2008. Disponível em: <http://pharmrev.aspetjournals.org.>. Acesso em: 20 ago. 2019

FLOOD, J. F.; MORLEY, J. E. Early onset of age-related impairment of aversive and appetitive learning in the SAM-P/8 mouse. **Journals of Gerontology**, v. 47, n. 2, p. 52–59, 1992.

FLOOD, J. F.; E. MORLEY, J. Learning and memory in the SAMP8 mouse. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 1–20, dez. 1997.

FORSELL, Y.; PALMER, K.; FRATIGLIONI, L. Psychiatric symptoms/syndromes in elderly persons with mild cognitive impairment. Data from a cross-sectional study. **Acta neurologica Scandinavica. Supplementum**, v. 179, n. 13, p. 25–28, 2003.

FREITAS, E. V. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013.

FUJII, S. et al. Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. **Brain Research**, v. 846, n. 1, p. 137–143, out. 1999.

GRAY, J. A; MCNAUGHTON, N. The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System. **Oxford University Press.** 2000.

HEIDERSTADT, K. M.; KENNETT, M. J. IACUC issues related to animal models of aging. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 52, n. 1, p. 106–9, 2011.

HOYLE, E. et al. Impaired performance of alpha7 nicotinic receptor knockout mice in the five-choice serial reaction time task. **Psychopharmacology**, v. 189, n. 2, p. 211–223, 2006.

HUNTER, R. G. et al. Regulation of the nicotinic receptor α7 subunit by chronic stress and corticosteroids. **Brain Res.**, v. 1325, p. 141–146, 14 abr. 2010.

IKEGAMI, S.; SHUMIYA, S.; KAWAMURA, H. Age-related changes in radial-arm maze learning and basal forebrain cholinergic systems in senescence accelerated mice (SAM). **Behavioural Brain Research**, v. 51, n. 1, p. 15–22, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estudos & Análises. Informação Demográfica e socioeconômica 3. Mudança Demográfica no Brasil**

no início do Século XXI. Subsídios para as Projeções da População. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão: IBGE, 2015.

IZQUIERDO, I. et al. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 80, n. 1, p. 115–127, mar. 2008.

KACZMARCZYK, M. M. et al. Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1553–1564, 2013.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2001.

KUMAR, A.; FOSTER, T. C. Linking Redox Regulation of NMDAR Synaptic Function to Cognitive Decline during Aging. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 40, p. 15710–15715, 2 out. 2013.

LEE, H.-K. Synaptic plasticity and phosphorylation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 3, p. 810–832, dez. 2006.

LEZAK, M. D.; HOWIESON, D. B.; BIGLER, E. D. Neuropsychological Assessment, 2012. Disponível em: https://doi.org/ISBN 978-0-19-539552-5

LI, R.; SINGH, M. Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 385–403, 2014.

LIN, N. et al. Tripchlorolide improves age-associated cognitive deficits by reversing hippocampal synaptic plasticity impairment and NMDA receptor dysfunction in SAMP8 mice. **Behavioural Brain Research**, v. 258, p. 8–18, jan. 2014.

MACHADO, J. C. Doença de Alzheimer. In: FREITAS, E. V. et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013. P. 288-318

MANAHAN-VAUGHAN, D. Group 1 and 2 metabotropic glutamate receptors play differential roles in hippocampal long-term depression and long-term potentiation in freely moving rats. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 3303–3311, 1997.

MANNAIONI, G. et al. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 5925–5934, 2001.

MANZONI, O. J.; WEISSKOPF, M. G.; NICOLL, R. A. MCPG Antagonizes Metabotropic Glutamate Receptors but not Long-term Potentiation in the Hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 1050–1054, 1994.

MARKOWSKA, A. .; SPANGLER, E. L.; INGRAM, D. K. Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse (SAM P8 and R1). **Physiology and Behavior**, v. 64, n. 1, p. 15–26, 1998.

MARTÍ BARROS, D. et al. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. **Neuroscience**, v. 126, n. 3, p. 651–656, 1 jan. 2004.

MATSUYAMA, S.; MATSUMOTO, A. Epibatidine induces long-term potentiation (LTP) via activation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in vivo in the intact mouse dentate gyrus: both alpha7 and alpha4beta2 nAChRs essential to nicotinic LTP. **Journal of pharmacological sciences**, v. 93, n. 2, p. 180–7, 2003.

MAURICE, T. et al. Beneficial effects of sigma agonists on the age-related learning impairment in the senescence-accelerated mouse (SAM). **Brain Research**, v. 733, n. 2, p. 219–230, set. 1996.

MAYFORD, M.; SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 6, p. 1–18, 2012.

MICHEL BAUDRY, XIAONING BI, CHRISTINE GALL, AND G. L. The Biochemistry of Memory: The Twenty-Six Year Journey of a “New and Specific Hypothesis”. **Neurobiol Learn Mem**, v. 95, n. 2, p. 125–133, 2012.

MIELKE, J. G.; MEALING, G. A R. Cellular distribution of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in rat hippocampus. **Neuroscience research**, v. 65, n. 3, p. 296–306, 1 nov. 2009.

MIYAMOTO, M. et al. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). **Physiology and Behavior**, v. 38, n. 3, p. 399–406, 1986.

MIYAMOTO, M. Characteristics of age-related behavioral changes in Senescence-Accelerated Mouse SAMP8 and SAMP10. **Experimental Gerontology**, v. 32, n. 1–2, p. 139–148, 1997.

MORLEY, J. E. et al. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer’s disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 650–656, 2012.

NETTO, M. P. O estudo da velhice: Histórico, definição do campo e termos básicos. In: FREITAS, E. V. et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013. P. 62-75

NEYMAN, S.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1345–1352, 2008.

NICOLETTI, F. et al. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 7–8, p. 1017–1041, 2011.

NIEWIADOMSKA, G.; BAKSALERSKA-PAZERA, M.; RIEDEL, G. The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. **Progress in Neuro-**

Psychopharmacology and Biological Psychiatry, v. 33, n. 5, p. 791–805, 1 ago. 2009.

NOMURA, Y. et al. Senescence-accelerated mouse: Neurochemical studies on aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 786, p. 410–418, 1996.

NOTT, A.; LEVIN, E. D. Dorsal hippocampal α7 and α4β2 nicotinic receptors and memory. **Brain Research**, v. 1081, n. 1, p. 72–78, 7 abr. 2006.

NUNES, M. A. et al. Chronic microdose lithium treatment prevented memory loss and neurohistopathological changes in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–26, 2015a.

NUNES, M. A. et al. Chronic Microdose Lithium Treatment Prevented Memory Loss and Neurohistopathological Changes in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015b.

NUNES, M. A.; VIEL, T. A.; BUCK, H. S. Microdose lithium treatment stabilized cognitive impairment in patients with Alzheimer's Disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 10, n. 1, p. 104–7, 2013.

PALLAS, M. et al. From Aging to Alzheimer's Disease: Unveiling "The Switch" with the Senescence-Accelerated Mouse Model (SAMP8). **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 15, n. 4, p. 615–624, 2008.

PANG, P. T.; LU, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: Role of secreted proteins tPA and BDNF. **Ageing Research Reviews**, nov. 2004. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163704000297>. Acesso em: 27 fev. 2018

PASCHOAL, S. M. P. Qualidade de vida na velhice. In: FREITAS, E. V. et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013. P. 185-195

PETROSINI, L. et al**.** On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. **Brain Research Reviews.** Elsevier, 1 out. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017309000770>. Acesso em: 27 fev. 2018

PIN, J. P.; DUVOISIN, R. Review: Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1–26, 1995.

RANG, H. P; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

REZVANI, A. H. et al. Effect of R3487/MEM3454, a novel nicotinic α7 receptor partial agonist and 5-HT3 antagonist on sustained attention in rats. **Progress in Neuro-**

Psychopharmacology and Biological Psychiatry, v. 33, n. 2, p. 269–275, 17 mar. 2009.

ROWE, J.W., KAHN, R. L. The Forum. **America**, v. 37, n. 4, p. 433–440, 1997.

RUTTEN, K. et al. Pharmacological validation of a refined burrowing paradigm for prediction of analgesic efficacy in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 18, n. 2, p. 213–222, 2014.

SAWANO, E. et al. Alterations in local thyroid hormone signaling in the hippocampus of the SAMP8 mouse at younger ages: Association with delayed myelination and behavioral abnormalities. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, n. 3, p. 382–392, 2013.

SHYTLE, R. D. et al. Cholinergic modulation of microglial activation by α7 nicotinic receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 2, p. 337–343, 2004.

SINOFF, G.; WERNER, P. Anxiety disorder and accompanying subjective memory loss in the elderly as a predictor of future cognitive decline. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 18, n. 10, p. 951–959, 2003.

SQUIRE, L. R.; DEDE, A. J. O. Conscious and unconscious memory systems. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, 2015.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T. The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 259–288, 21 jul. 2011.

TAKEDA, T. et al. A new murine model of accelerated senescence. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 17, n. 2, p. 183–194, out. 1981.

TAKEDA, T. Senescence-accelerated mouse (SAM): A biogerontological resource in aging research. **Neurobiology of Aging**, v. 20, n. 2, p. 105–110, 1999.

TAKEDA, T.; HOSOKAWA, M.; HIGUCHI, K. Senescence- Accelerated Mouse (SAM): A Novel Murine Model of Accelerated Senescence. **J Amer Geriatr Soc**, v. 39, p. 911–919, 1991.

TAKEDA, T.; HOSOKAWA, M.; HIGUCHI, K. Senescence-Accelerated Mouse (SAM): A novel murine model of senescence. **Experimental Gerontology**, v. 32, n. 1–2, p. 105–109, 1997.

TULVING, E. How Many Memory Systems Are There? **American Psychologist**, v.40, n.4, p. 385–398, 1985.

VALENZUELA, M. J. **Brain reserve and the prevention of dementia. Current Opinion in Psychiatry**, maio 2008. Disponível em: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001504-200805000-00014>. Acesso em: 27 fev. 2018

WAITE, L. M. Treatment for Alzheimer's disease: Has anything changed? **Australian**

Prescriber, v. 38, n. 2, p. 60–63, 2015.

WANG, H. L. et al. Age-related alterations of neuronal excitability and voltage-dependent Ca 2+ current in a spontaneous mouse model of Alzheimer's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 321, p. 209–213, 2017.

WETHERELL, J. L. et al. Anxiety, cognitive performance, and cognitive decline in normal aging. **Journals of Gerontology - Series B Psychological Sciences and Social Sciences**, v. 57, n. 3, p. P246–P255, 2002.

YAGI, H. et al. Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. **Brain Research**, v. 474, n. 1, p. 86–93, 1988.

YANAI, S.; ENDO, S. Early onset of behavioral alterations in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). **Behavioural Brain Research**, v. 308, n. December, p. 187–195, 2016.

YAU, J. L. W. et al. Chronic treatment with the antidepressant amitriptyline prevents impairments in water maze learning in aging rats. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 4, p. 1436–1442, 15 fev. 2002.

YOUNG, J. W. et al. Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 145–155, 2007.

ZHOU, M. M. et al. Comparative Study of Different Polar Groups of EPA-Enriched Phospholipids on Ameliorating Memory Loss and Cognitive Deficiency in Aged SAMP8 Mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 62, n. 7, p. 1–13, 2018.